

PARASITISMO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY POR

MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* RIFAI

ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO

Bióloga

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A  
Estado de São Paulo - Brasil  
Janeiro - 1995

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da  
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

---

Cassiolato, Ana Maria Rodrigues

C345p Parasitismo de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de  
Bary por mutantes de *Trichoderma harzianum* Rifai.  
Piracicaba, 1995.  
133p. ilus.

Tese - ESALQ  
Bibliografia.

1. Alface - Doença - Controle biológico 2. Fungo  
para controle biológico 3. Hifomiceto - Melhoramento  
4. Hifomiceto - Resistência ao fungicida 5. Podridão  
de esclerotinia em alface - Controle biológico I. Esco  
la Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.24  
635.52

PARASITISMO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY POR

MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* RIFAI

ANA MARIA RODRIGUES CASSIOLATO

Aprovada em: 23.03.1995

Comissão julgadora :

|   |               |
|---|---------------|
| Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo                                     | ESALQ/USP     |
| Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Alina Aparecida Pizzirani-Kleiner | ESALQ/USP     |
| Dr. Itamar Soares de Melo   | CNPMA/EMBRAPA |
| Dr. Pedro José Valarini   | CNPMA/EMBRAPA |
| Prof <sup>a</sup> Dr <sup>a</sup> Luzia Doretto Paccola Meireles    | UEL           |



Dr. Itamar Soares de Melo

Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao Dr. Itamar Soares de Melo, pela orientação, compreensão e amizade;

Ao Dr. Ralph "Tex" Baker, *in memoriam*, pelos inesquecíveis ensinamentos, incentivos e amizade;

Ao Dr. Gary McIntyre, Chefe do Department of Plant Pathology and Weed Science, Colorado State University, Co, USA, pela amizade e incentivo ao permirtir-me continuar usando dos laboratórios e casas-de-vegetação na ausência do querido Dr. Ralph Tex Baker;

À minha família, e em especial à minha mãe Luiza, pelo carinho inesgotável, estímulos e ajuda;

Aos Engenheiros Agrônomos, MS, Antonio Carlos F. da Silva e Dr<sup>a</sup>. Tania Marta C. dos Santos, à Bibliotecária Nilce T. P. Nass e à Lisa Arévalos, pela carinhosa amizade e encorajamento constantes;

Aos Engenheiros Agrônomo Dr. Luciano L. Nass e Everaldo Piccinin, pela amizade e revisão dos originais;

À Bibliotecária Silvana Marchizelli Gregório, pelo auxílio na revisão das Referências Bibliográficas;

Aos Professores, Funcionários, Amigos e Colegas dos Departamento de Genética, ESALQ/USP, CNPMA/EMBRAPA e Department of Plant Pathology and Weed Science da CSU, CO, USA, pelo apoio constante e amizade ;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio concedido.



## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMO .....   | viii   |
| SUMMARY .....  | x      |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 01     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 03     |
| 2.1. Controle biológico de fitopatógenos .....   | 03     |
| 2.2. <i>Trichoderma</i> sp., agente de controle de<br>fitopatógenos .....  | 05     |
| 2.3. Indução de mutação em <i>Trichoderma</i> sp. vi-<br>sando controle biológico .....                            | 09     |
| 2.4. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>S. minor</i> -<br>agentes causais da podridão de esclerotí-<br>nia ..... | 15     |
| Taxonomia, hospedeiros e distri-<br>buição geográfica .....  | 15     |
| Perdas econômicas .....  | 15     |
| Etiologia e epidemiologia .....  | 17     |
| Manejo de controle de<br><i>Sclerotinia</i> sp. ....   | 21     |
| Controle biológico de<br><i>Sclerotinia</i> sp.....  | 25     |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS .....   | 30     |
| 3.1. LOCAIS DE INVESTIGAÇÕES .....   | 30     |
| 3.2. HOSPEDEIRO TESTE .....  | 30     |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 3.3.    | ISOLADOS DE FITOPATÓGENOS E ANTAGONISTAS UTILIZADOS .....  | 30 |
| 3.4.    | MEIOS DE CULTURAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS  | 30 |
| 3.4.1.  | Meio Mínimo .....  | 31 |
| 3.4.2.  | Meio Completo .....  | 32 |
| 3.4.3.  | Meio Batata-Dextrose-Ágar .....  | 32 |
| 3.4.4.  | Meio de Aveia-Ágar .....   | 32 |
| 3.4.5.  | Meio Extrato de Malte .....  | 32 |
| 3.4.6.  | Meio Czapeck-Dox .....   | 32 |
| 3.4.7.  | Meio Mineral para Microrganismos Celulolítico .....  | 33 |
| 3.4.8.  | Solução de Vitaminas .....   | 33 |
| 3.4.9.  | Solução de Caseína Hidrolisada ..  | 34 |
| 3.4.10. | Solução de Extrato de Levedura ..  | 34 |
| 3.4.11. | Soluções de Requisitos Nutricionais .....  | 34 |
| 3.4.12. | Solução Salina .....   | 35 |
| 3.4.13. | Solução de "Tween 80" .....  | 35 |
| 3.4.14. | Solução de Desoxicolato de Sódio   | 35 |
| 3.4.15. | Solução de HCl 1N .....  | 35 |
| 3.4.16. | Soluções-Estoque de Fungicidas ..  | 35 |
| 3.5.    | MANUTENÇÃO E PREPARO DOS INÓCULOS .....  | 36 |
| 3.6.    | OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS ATRAVÉS DA IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA .....   | 37 |
| 3.6.1.  | Mutantes obtidos através do Isolamento Total .....   | 37 |
| 3.6.2.  | Mutantes obtidos através de Enriquecimento por Filtração ....  | 38 |
| 3.6.3.  | Teste de Reversão .....  | 39 |
| 3.7.    | VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL E ESPORULAÇÃO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 NOS MEIOS DE CULTURA BDA E AVEIA .....  | 39 |
| 3.8.    | TESTE DE ANTIBIOSE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> #1, <i>in vitro</i> ..... | 40 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.9.  | TESTE DE ANTAGONISMO EM CONFRONTAÇÃO DIRETA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> #1, <i>in vitro</i> .....   | 41 |
| 3.10. | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPERPARASÍTICA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 SOBRE ESCLERÓDIOS DE <i>S. sclerotiorum</i> #1, <i>in vitro</i> .....  | 42 |
| 3.11. | TESTE DE SENSIBILIDADE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 AO FUNGICIDA BENOMIL, <i>in vitro</i> .....  | 43 |
| 3.12. | SELEÇÃO EM PLACA PARA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 PELO MÉTODO SEMI QUANTITATIVO .....  | 43 |
| 3.13. | TESTE DE SENSIBILIDADE DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> TW-T95 EM RELAÇÃO AOS FUNGICIDAS IPRODIONE E BENOMIL, <i>in vitro</i> .....   | 44 |
| 3.14. | VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO MICELIAL DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> TW-T95, EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO CZAPECK-DOX, FRENTE À DIFERENTES FONTES DE CARBONO, <i>in vitro</i> .....                    | 45 |
| 3.15. | AVALIAÇÃO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 NA ATIVIDADE HIPERPARASÍTICA SOBRE OS ESCLERÓDIOS DE <i>S. sclerotiorum</i> #1, <i>in vitro</i> .....   | 46 |
| 3.16. | COMPORTAMENTO ANTAGÔNICO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95, CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> #1 E <i>S. minor</i> , SOBRE SEGMENTOS DE AIPO, <i>in vitro</i> .....                             | 49 |
| 3.17. | COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 SOBRE ESCLERÓDIOS DE <i>S. sclerotiorum</i> #1 e <i>S. minor</i> , EM VASOS CONTENDO SOLO NATURAL E PLANTAS DE ALFACE, <i>in vivo</i> ..... | 50 |
| 3.18. | INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 NA PRODUÇÃO DE ESTIPES E/OU APOTÉCIOS FORMADOS POR <i>S. sclerotiorum</i> #1 e 2, <i>in vitro</i> .....  | 51 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.19. | INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 SOBRE ESTIPES E/OU APOTÉCIOS DE <i>S. sclerotiorum</i> #2, FORMADOS E TRATADOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO, E A SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE ALFACE, <i>in vivo</i> ..... | 51 |
| 3.20. | INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 SOBRE ESTIPES DO ISOLADO <i>S. sclerotiorum</i> #1 E 2, NA PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, <i>in vivo</i> .....   | 53 |
| 3.21. | INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 SOBRE ESCLERÓDIOS DE <i>S. sclerotiorum</i> #2, EM PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, E A SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE ALFACE, <i>in vivo</i> .....             | 53 |
| 3.22. | COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ALFACE, <i>in vivo</i> .....   | 54 |
| 3.23. | COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ALFACE, EM PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, <i>in vivo</i> .....   | 54 |
| <br>  |   |    |
| 4.    | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   |    |
| 4.1.  | OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5.  | 56 |
| 4.2.  | TESTE DE ANTIBIOSE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE <i>T. harzianum</i> TW5 CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> #1 .....   | 58 |
| 4.3.  | COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 À DIFERENTE FONTES DE CARBONO, <i>in vitro</i> .....  | 60 |
| 4.4.  | SENSIBILIDADE DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 AOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, <i>in vitro</i> .....   | 66 |
| 4.5.  | AVALIAÇÕES DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 CONTRA <i>S. sclerotiorum</i> #1 E 2 E <i>S. minor</i> .....   | 71 |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.6. | COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE <i>T. harzianum</i> TW5 E <i>T. harzianum</i> WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ALFACE, EM AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE..... | 82  |
| 5.   | CONCLUSÕES .....   | 87  |
|      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 88  |
|      | TABELAS.....   | 104 |
|      | APÊNDICE .....   | 121 |

PARASITISMO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY POR  
MUTANTES DE *Trichoderma harzianum* RIFAI

Aluna: Ana Maria Rodrigues Cassiolato

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos a obtenção de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 e a avaliação do potencial antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95 contra *S. sclerotiorum*.

Pelo método de Isolamento Total foram recuperados 28 mutantes morfológicos e nenhum mutante auxotrófico enquanto que pelo método de enriquecimento por filtração foram recuperados 11 mutantes auxotróficos e nenhum mutante morfológico. Os mutantes auxotróficos apresentaram variações quanto ao diâmetro de crescimento e esporulação nos meios de cultivo BDA e Aveia, e apenas o mutante TW5-523 mostrou capacidade para inibir completamente o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* #1. Os mutantes TW5-410 e TW5-523 também mostraram resistência à 1000 e 500ppm do fungicida Benomil, respectivamente.

Os mutantes de *T. harzianum* TW5 e WT-T95 reduziram o número de escleródios formados por *S. sclerotiorum*, porém não exibiram atividade hiperparasítica sobre escleródios.

Com exceção do TW5-2B1, os mutantes produziram os mais

altos pesos de matéria seca em presença da fonte de carbono Laminarina. Frente às fontes fibras de algodão, carboximetil celulose, celobiose e glucose, os mutantes mostraram-se superiores à linhagem selvagem TW5. O mutante T95 mostrou-se superior à linhagem selvagem WT-T95 quando em presença da fibra de algodão e da celulose microcristalina.

Os mutantes e linhagens selvagens *T. harzianum* TW5 e WT-T95 exibiram uma alta atividade antagonista de micélio de *S. minor* sobre aipo, assim como, reduziram o número de estipes e/ou apotécios formados por *S. sclerotiorum*.

O mutante TW5-2B2, seguido por TW5-2B1, TW5-2B6 e T95, comportaram-se como promotores de crescimento de plantas de alface.

PARASITISM OF *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) DE BARY BY  
MUTANTS OF *Trichoderma harzianum* RIFAI

Author: Ana Maria Rodrigues Cassiolato

Adviser: Dr. Itamar Soares de Melo

SUMMARY

The objectives of the present research were to obtain auxotrophic mutants of *T. harzianum* TW5 and to evaluate the antagonistic potential of mutants of *T. harzianum* against *S. sclerotiorum*.

By Total Isolation method, 28 mutants were recovered and none auxotrophic mutant, and by Filtration Enrichment method, 11 mutants were recovered and none morphologic mutants. The auxotrophic mutants presented variation in regard to growth diameter and sporulation when they were grown in PDA and Oat Meal media. TW5-523 mutant was able to inhibit the mycelial growth of *S. sclerotiorum* #1. The TW5-410 and TW5-523 mutants showed resistance to Benomyl at 1000 and 500ppm, respectively.

All of the mutants and wild types showed to reduce the sclerotia production by *S. sclerotiorum* #1, but did not exhibit hyperparasitic activity against sclerotia.

Exception for TW5-2B2, the mutants produced significantly higher biomass than the wild type TW5, in Czapeck-Dox broth without saccharose with laminarina as a sole source of carbon



All of *T. harzianum* TW5 mutants produced higher dry weights than its wild types, when ground cotton linter, carboxymethyl cellulose, cellobiose and glucose were used as carbon source. The mutant T95 produced higher dry weights than its wild type, when ground cotton linter and microcrystalline cellulose as carbon source.

Benomyl resistant mutants exhibited an antagonistic activity against mycelial of *S. minor*, on pieces of celery, as well to reduce the stipes and/or apothecia production by *S. sclerotiorum* #1 and 2, *in vitro*.

TW5-2B2, followed by TW5-2B1, TW5-2B6 e T95, amended on the substrate, showed to enhance the lettuce plant growth.

## 1. INTRODUÇÃO

Embora o controle biológico ocorra naturalmente e seja a principal razão de certas doenças não serem geralmente catastróficas, ainda não se tem conhecimento suficiente para explicar como este controle opera na natureza ou, como os muitos fatores abióticos e bióticos poderiam ser manipulados para dar um controle econômico à um patógeno.

A introdução de antagonistas no ecossistema é um método alternativo, não-químico, de controlar certas doenças. O fungo *Trichoderma* é considerado como promissor antagonista à fungos fitopatogênicos, pois além de ser saprófita e hiperparasita, também é produtor de antibióticos voláteis e não-voláteis de amplo espectro, o que eleva sua capacidade competitiva e eficiência.

Como a parede celular dos fitopatógenos, de forma geral, é composta de  $\beta$ -(1,3)-glucana e quitina e, em alguns casos, celulose, isolados de *Trichoderma* têm mostrado habilidade em crescer sobre esta parede celular, ou em utilizar o conteúdo celular de escleródios para o seu crescimento e esporulação, após a degradação da parede celular.

A indução de resistência à fungicidas em *Trichoderma* spp. e a seleção de linhagens geneticamente estáveis para serem utilizadas no controle integrado, é uma das estratégias visando o efetivo controle de um ou mais patógenos, com a grande vantagem de seu efeito ser mais duradouro no ambiente, quando comparado com o efeito efêmero de um fungicida.

A produção da alface constitui numa importante fonte de renda aos horticultores. Normalmente, os cultivos se sucedem de maneira contínua numa mesma área, propiciando o desenvolvimento de fitopatógenos. *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* são fungos cosmopolitas que apresentam uma ampla variedade de hospedeiros suscetíveis e de importância econômica, especialmente entre as hortícolas. A podridão de esclerotínia constitui numa grande preocupação, visto que as cultivares usadas são suscetíveis à estes patógenos. Devido, principalmente, ao hábito de crescimento da alface, o controle químico tem mostrado eficácia parcial enquanto as medidas de controle recomendadas nem sempre são eficientes (BARROS, 1988). Portanto, procedem os estudos com *T. harzianum* como a utilização de técnicas para o melhoramento deste antagonista objetivando o controle biológico e/ou integrado.

Deste forma, este trabalho teve como objetivos:

- . obtenção e caracterização de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 quanto ao crescimento micelial e esporulação em meios de cultura; à atividade antagônica por antibiose e hiperparasitismo de *S. sclerotiorum*; à atividade celulolítica e à sensibilidade aos fungicidas benomil e iprodione;

- . verificação da produção micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 frente à diferentes fontes de carbono;

- . comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 contra *S. sclerotiorum* e *S. minor*, sobre segmentos de aipo, *in vitro*;

- . influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por isolados de *S. sclerotiorum* #1 e/ou 2, e sobrevivência de plantas de alface, em presença ou ausência dos fungicidas benomil e iprodione;

- . estudos de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 como promotores de crescimento de plantas de alface, em presença ou ausência dos fungicidas benomil e iprodione.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Controle biológico de fitopatógenos

O controle de patógenos de plantas através do controle químico têm ocorrido por centenas de anos. Avanços significativos no campo da química orgânica tem resultado em uma ampla variedade de compostos, principalmente para serem usados contra fungos. No entretanto, o uso de tais produtos químicos acarretam altos custos, não apenas para os agricultores mas também para o meio ambiente. Assim, a idéia de controle biológico esta começando a tornar-se uma alternativa particularmente atrativa (BAKER & DICKMAN, 1992).

Os principais objetivos do controle biológico são o de manter, através do emprego de certas práticas e da introdução de uma biomassa de antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em perfeito equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado juntamente com os patógenos e os organismos úteis. Tais níveis de equilíbrio poderão ser alcançados através da elaboração de um sistema integrado de produção, com destaque no controle biológico, sem perda significativa da produtividade agrícola, com vantagem de se obter maior economicidade e menores riscos de impactos no ambiente (ROBBS, 1991).

A eficácia, praticidade e segurança das estratégias e métodos para as aplicação e manutenção dos antagonistas microbianos são fundamentais tanto para o sucesso do

biocontrole nos sistemas de cultivo, quanto para a aceitação do biocontrole pelos agricultores e sociedade. Para o microrganismo introduzido, as considerações mais importantes incluem: viabilidade, formulações e concentrações dos organismos de biocontrole; tipos de adjuvantes empregados; a eficiência e intervalos de aplicações dos organismos e adjuvantes para alvo; condições microclimáticas durante e após as aplicações e custos. O tipo e incorporação do substrato, e a dispersão do inóculo à partir deste substrato para o meio de cultivo, são de extrema importância (Cook, 1992, citado por SUTTON & PENG, 1993).

O controle biológico de fitopatógenos, como definido por COOK & BAKER (1983) trata da redução do ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por, ou através de um ou mais organismos, exceto o homem. Como mecanismos controladores estão: a) uso de indivíduos ou populações apatogênicas ou hipopatogênicas; b) manipulação das plantas hospedeiras empregando-se práticas culturais e/ou microrganismos; c) emprego de microrganismos antagonistas com capacidade para reduzirem a sobrevivência e/ou atividades do patógeno.

Os agentes de biocontrole de fitopatógenos devem possuir mecanismos básicos de antagonismo válidos tanto para o rizoplano como para o filoplano, que incluem: a) antibiose, através da produção de um ou mais metabólitos capazes de inibir ou destruir outros organismos; b) competição, geralmente por nutrientes, por sítios de infecção, oxigênio, etc.; c) parasitismo direto ou hiperparasitismo de um microrganismo pelo outro (COOK & BAKER, 1983).

A redução dos fitopatógenos dá-se através da: a) redução de inóculo do patógeno pelo decréscimo de sobreviventes entre colheitas, do decréscimo da produção ou liberação de propágulos viáveis, ou, da redução na expansão do crescimento micelial; b) redução da infecção do hospedeiro pelo patógeno; c) redução da severidade do ataque pelo patógeno (BAKER & COOK, 1974).

As espécies de *Trichoderma* têm sido caracterizadas como antagonistas altamente eficientes. Como um componentes importante da microflora, ocorrem em solos de todo o mundo. *T. harzianum* e *T. hamatum* têm sido frequentemente associados a solos supressivos à uma série de fungos fitopatogênicos (MELO, 1991; HENIS *et al*, 1984; ELAD *et al*, 1980; BAKER & COOK, 1974; RIFAI, 1969).

## 2.2 - *Trichoderma* sp., agente de controle de fitopatógenos

O gênero *Trichoderma* é um Deuteromyceto, sub-classe Hyphomycetae, ordem Moniliales, família Moniliaceae. São fungos que produzem conídios em abundância à partir de conidióforos que se originam diretamente das hifas. As espécies deste gênero não são distinguidas facilmente por simples comparação de culturas, mas sim baseadas no tipo de ramificação dos conidióforos e modo de disposição das fiálides (ALEXOPOULOS & MINS, 1979).

As atividades parasíticas dos que consomem outros parasitas de plantas superiores, e com o objetivo de biocontrole de doenças, foram denominadas hiperparasitismo, ou, àquelas que parasitam fungos, micoparasitismo. Sendo uma forma comum de simbiose entre muitos grupos de organismos, o parasitismo estabelece relações nutricionais que favorecem a existência do parasita (BARNETT & BINDER, 1973; BOOSALIS, 1964; BARNETT, 1963).

As interrelações nutricionais entre o fungo hospedeiro e o fungo parasita levou à divisão dos micoparasitas em necrotróficos e biotróficos. Os parasitas biotróficos obtêm nutrientes de células vivas e quase não causam danos ao hospedeiro, ou, estes podem inicialmente viver como parasita biotrófico e por último destruírem o protoplasma do hospedeiro como um parasita necrotrófico (BARNETT & BINDER, 1973). Ao entrarem em contato com o hospedeiro, os parasitas necrotróficos excretam uma substância tóxica que mata as

células do hospedeiro, utilizando em seguida, os nutrientes que são liberados. A maioria dos micoparasitas é constituída por saprófitas que se caracterizam pelo rápido crescimento sobre diversos substratos (BARNETT, 1963). Esta divisão, entretanto, não é totalmente aceita, pois existem relatos de micoparasitas necrotróficos que se comportam como biotróficos quando seu desenvolvimento é favorecido pela vida ao invés da morte da estrutura do hospedeiro e, em alguns casos, a morte do hospedeiro não dá-se devido à excreção de substâncias tóxicas (BAKER, 1987a; AYERS & ADAMS, 1979).

Diversos exemplos de micoparasitismo mostram-se promissores no controle biológico de doença de fungo do solo. *Trichoderma* sp. é um hiperparasita com capacidade de efetivamente reduzir doenças causadas por fitopatógenos (PAPAVIZAS, 1985).

Através dos estudos do parasitismo de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. foi observado o quimiotropismo do antagonista pelo patógeno. O material fibrilar depositado durante esta interrelação foi o polissacarídeo lectina, presente na parede do fitopatógeno. Em resposta à este estímulo químico, *Trichoderma* spp. detecta seu hospedeiro (ELAD *et al*, 1987; CHET & ELAD, 1983).

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista, isto é, antibiose, competição e hiperparasitismo se sobrepõem prejudicando o crescimento dos competidores. Por exemplo, o antagonista causa a morte e degradação das hifas hospedeiras pela secreção de metabólitos tóxico. Além disso, quando se estabelece o contato entre os dois fungos, o antagonista pode tanto exibir um crescimento paralelo ao de seu hospedeiro como enrolar-se nele. Estes, produzem estruturas semelhantes à apressórios que se aderem à parede do hospedeiro. O micoparasita irá digerir partes da parede celular do hospedeiro, invadindo e crescendo dentro de suas hifas, utilizando-se do conteúdo das células mortas. Assim, os

antibióticos voláteis e/ou não-voláteis e as enzimas poderão reduzir a taxa de crescimento micelial dos fitopatógenos. As hifas do hospedeiro, próximas ao *Trichoderma*, normalmente mostraram alterações morfológicas como vacuolização e coagulação do citoplasma. Desta forma, pela ação dos antibióticos e/ou das enzimas, ou pela ação de ambos, torna possível ao *Trichoderma* conseguir nutrientes à partir destes fungos (ELAD *et al*, 1987; CHET & ELAD, 1983; COOK & BAKER, 1983; DENNIS & WEBSTER, 1971a).

O micoparasitismo parece estimular a reprodução sexual do parasita, embora o fator nutricional requerido para sua reprodução sexual não seja necessariamente um requisito básico para o parasitismo. No entanto, o micoparasita pode parasitar algumas espécies de fungos sem que haja a produção de esporos sexuais. Estes hospedeiros, embora não possuam substâncias necessárias para a reprodução sexual, certamente contém alguns fatores que são imprescindíveis para o parasitismo (BOOSALIS, 1964). Não só o micélio, mas também muitas outras estruturas do hospedeiro são atacadas pelos micoparasitas. *Trichoderma* spp. têm mostrado eficiência na destruição de estruturas de resistência que normalmente escapam às ações de predadores, tais como, cistos, microescleródios, oosporos, escleródios e esporos (MELO, 1991).

A competição intra e inter-específica entre organismos é um importante fator o qual determina a densidade das populações na natureza. Os antibióticos representam um importante papel no antagonismo. Espécies de *Trichoderma* produzem antibióticos de amplo espectro, elevando sua capacidade competitiva (ELAD *et al*, 1984; DUTTA, 1981; HADAR *et al*, 1979). Os antibióticos excretados ao contato direto entre microrganismos, embora produzidos continuamente e em baixas concentrações, podem estar menos sujeitos à decomposição biótica (BAKER, 1987b). A capacidade para produzir tais substâncias varia entre isolados da mesma espécie bem como entre isolados de diferentes espécies. *Trichoderma* spp. têm mostrado produzir gliotoxina e



viridina além de outros antibióticos. *Trichoderma viride* e *Trichoderma polysporum* produzem trichodermina, *Trichoderma hamatum* produzem antibióticos pépticos, enquanto *T. harzianum* produzem a harzianopiridona. No entanto, gliotoxina e viridina são produzidas por todos, embora em pequenas quantidades (CLAYDON *et al*, 1987; DENNIS & WEBSTER, 1971a).

A antibiose, competição, predação e micoparasitismo necrotrófico podem resultar em lise e derramamento do conteúdo celular do hospedeiro no ambiente (COOK & BAKER, 1983). Vários dos metabólitos tóxicos produzidos *in vitro* por *Trichoderma* spp. foram detectados em frações da matéria orgânica do solo (Wright, 1965, citado por PAPAIVIZAS, 1985), porém, não há evidências diretas que estes antibióticos sejam excretados ao solo em quantidade suficiente para induzir efetivos resultados de controle biológico de fitopatógenos (PAPAIVIZAS, 1985).

A parede celular de fungos patogênicos é composta de  $\beta$ -1,3-glucana e quitina e, em alguns casos, celulose. Isolados de *Trichoderma* sp. são capazes de crescer sobre a parede celular desses patógenos, utilizando-a como fonte de carbono. Estes antagonistas possuem sistemas enzimáticos capazes de degradar componentes da parede celular do hospedeiro através da produção de enzimas hidrolíticas como  $\beta$ -1,3-glucanase, celulase, quitinase e outras (CHET & ELAD, 1983). Algumas espécies utilizam o conteúdo celular de escleródios ( $\beta$ -1,3-glucanas, quitinas e lipídios) para seu crescimento e esporulação, após a degradação da parede celular. O antagonismo às estruturas de resistência do hospedeiro pode levar à destruição do inóculo do patógeno (ELAD *et al*, 1984; HADAR *et al*, 1979; JONES, 1970).

*Trichoderma* spp. representam os fungos mais estudados em controle biológico por possuírem atividade antagônica à vários fitopatógenos, tais como: *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia cepivorum*, *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *S. minor*, *Verticillium*

*dahliae*, entre outros (ELAD *et al*, 1983; SILVA & MELO, 1989; PERES & MELO, 1989; UPADHYAY & MUKHOPADHYH, 1992; PAPAVIDAS, 1985; COOK & BAKER, 1983; HARMAN & HADAR, 1983; PAPAVIDAS & LEWIS, 1983; PAPAVIDAS *et al*, 1982; DAVET *et al*, 1981; CHET *et al*, 1979; BACKMAN & RODRIGUEZ-KABANA, 1975).

### 2.3 - Indução de mutação em *Trichoderma* sp. visando controle biológico

A despeito das vantagens dos microrganismos benéficos, na prática são raramente empregados pois têm mostrado resultados menos consistentes que seus competidores, o controle químico (HARMAN *et al*, 1989). Estudos têm focado a necessidade da produção de linhagens geneticamente modificadas, com o objetivo de produzir biótipos superiores, melhor adaptados ao meio ambiente.

Os microrganismos, incluindo os fungos, por serem geralmente haplóides, facilitaram a indução de mutações por agentes físicos e químicos. De fato, este é um método que, embora simples, tem produzido resultados importantes no melhoramento genético, como por exemplo, a indução de mutação melhorando o rendimento e qualidade de enzimas sintetizadas (AZEVEDO, 1991), ou melhorar a produção de antibióticos ou enzimas líticas por fungos utilizados no biocontrole (CHET & ELAD, 1983; DENNIS & WEBSTER, 1971a,b). Se, por outro lado, o organismo for usado em associação com produtos químicos, é importante a indução de mutações que tornem esses microrganismos resistentes à estes compostos (AZEVEDO, 1991).

A indução de resistência à fungicidas em *Trichoderma* spp. e a seleção de linhagens estáveis geneticamente, para serem utilizadas em combinações com fungicidas, é uma das várias estratégias visando um controle efetivo de um ou mais patógenos. Uma grande vantagem na utilização de um antagonista resistente é seu efeito mais duradouro no ambiente, quando

comparado com o efeito efêmero de um fungicida (MELO, 1991).

Os mutantes de *T. harzianum*, obtidos através da irradiação ultra-violeta, têm diferidos consideravelmente das linhagens selvagens quanto ao hábito de crescimento, sobrevivência no solo, atividade hiperparasítica, produção de metabólitos, resistência à fungicidas, entre outros (PAPAVIZAS, *et al*, 1982). Mutantes de *T. reesei* e *T. viride*, resistentes à altas concentrações de benomil, iprodione e maneb, mantiveram a característica de inibirem os fitopatógenos *Venturia inaequalis*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (BENSACI & NEUMANN, 1989).

PAPAVIZAS *et al* (1982) utilizando-se de *T. harzianum* (WT6), obtiveram mutantes que, além da resistência à benomil, apresentaram elevada produção de metabólitos, melhorando o desempenho antagonista na supressão de *R. solani* em algodão e rabanete, *S. rolfsii* em cebola e *Pythium* sp em ervilha. PAPAVIZAS & LEWIS (1983) obtiveram mutantes de *T. viride* T1, resistentes aos fungicidas benomil, thiabendazole e tiofanato metílico, com a habilidade para suprimir *P. ultimum* em ervilha e *S. rolfsii* em feijão.

GULLINO & GARIBALDI (1988) obtiveram mutantes resistentes à diversos fungicidas, que foram ativas contra míldio e mofo-cinzento e que, mesmo quando aplicadas na ausência dos fungicidas, controlavam parcialmente *B. cinerea*.

MELO & SILVA (1991) obtiveram 10 mutantes de *T. harzianum* com alta resistência ao benomil e capacidade de inibir o crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. minor* e *S. rolfsii*.

Irradiação ultravioleta seguida de mutagênico químico Dietil sulfonato, permitiu que LIU (1988) obtivesse um mutante de *T. harzianum* resistente ao benomil e sem perda da capacidade de micoparasitismo, lise e antibiose contra *R. solani* e *S. rolfsii*. Em ensaios de campo, reduziu a severidade da doença de crisântemo e feijão causada por *R. solani*.

KRAFT & PAPAVIZAS (1983) obtiveram mutantes de *T.*

*harzianum* WT6 tolerante à Metalaxyl que, quando aplicados em tratamento integrado de sementes e usadas em campo infestado com *P. ultimum*, resultaram em plantas mais saudáveis e melhor produção. Foi constatado que a população de *T. harzianum* aumentou ligeiramente na presença do fungicida.

Diferente de muitas bactérias, os fungos não colonizam o plano ou espaço imediatamente adjacente à raiz em crescimento quando aplicados às sementes. A carência desta habilidade, chamada rizosfera incompetência, é uma característica desvantajosa para os fungos antagonistas (CHAO *et al*, 1986; PAPAIVIZAS, 1981).

*T. harzianum* tem mostrado-se um eficiente agente de biocontrole. No entanto, relatos como os de HARMAN & HADAR (1983), quando *Trichoderma* spp. foram aplicados como tratamento de sementes, correlacionam a falta de controle do tombamento de plantas causado por *Pythium* sp. com a rizosfera incompetente de *Trichoderma* spp. (CHAO *et al*, 1986; PAPAIVIZAS, 1981). Assim, existe a necessidade de obter-se mutantes com capacidade de colonizar não apenas a espermosfera, mas também acompanhar o desenvolvimento da raiz. Baseado neste enfoque, mutantes resistentes à fungicidas teriam a colonização de rizosfera facilitada pela adição de fungicida ao solo. O produto químico afetaria os colonizados oferecendo vantagens ao *Trichoderma* spp.

AHMAD & BAKER (1987a) obtiveram mutantes resistentes ao benomil de *T. harzianum* (T95 e T12b), *T. koningii* (T 2-8), *T. viride* (TS-1), por exposição ao agente mutagênico N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina. As sementes foram tratadas com suspensão de esporos e plantadas em tubos de polipropileno preenchidos com solo, com adição ou não do fungicida benomil. Quando tratadas com os mutantes, estes foram detectados na rizosfera da raiz de 1 até 8cm de profundidade, após 8 dias. O mesmo não ocorreu para a linhagem selvagem. A densidade populacional dos mutantes, por toda a extensão da raiz, foi

acima de  $10^7$  u.f.c./g/solo.

A habilidade em colonizar a raiz pode ser semelhante a habilidade saprofítica competitiva (CSA). Este fato parece justificar o fato destes mutantes terem exibido competência em rizosfera (AHMAD & BAKER, 1987b). A mucilagem é um material gelatinoso presente na superfície das raízes em crescimento. É composto do mucigel das raízes das plantas, células bacterianas, produtos metabólicos, colóides orgânicos e material mineral. O mucigel tem quatro principais fontes: originados nas pontas das raízes e secretados pelo Complexo de Golgi; das hidrólises dos polissacarídeos constituintes das paredes celulares primária; das secreções realizadas pelas células epidermais; e dos produtos das degradações microbianas das células epidermais mortas (Rovira *et al*, 1979, citado por SULTAN, 1994). Desta forma, a mucilagem é constituída, na sua maior parte, de carboidratos (provavelmente compostos por uma mistura de glucanas na forma de microfibras) e polissacarídeos heterogêneos. Os açúcares comumente encontrados são: glucose, arabinose, fucose, xilose, galactose, manose e ácido urônico. Microrganismos têm sido encontrados dentro desta mucilagem, a qual pode servir como fonte de energia de grande importância. As populações de microrganismos saprofíticos presente nesta mucilagem, parece proteger as raízes contra de fitopatógenos (OADES, 1978).

AHMAD & BAKER (1987a,b,c) formularam a hipótese que os mutantes resistente ao benomil eram rizosfera competente por utilizarem de forma mais eficiente que as linhagens selvagens, os substratos celulítico recobrimo as raízes. Parte da hipótese foi comprovada quando os mutantes *T. harzianum* T95 e T12B exibiram índices da atividade celulolítica mais alto e que as linhagens, *in vitro*. Persistindo nesta hipótese, SULTAN (1994), utilizando-se da microscopia eletrônica, observou a presença da mucilagem na superfície da raiz assim como a associação das hifas de *T. harzianum* T95 com o mucigel.

Posteriormente, em presença de mucigel purificada, constatou as altas taxas de germinação dos conídios pelos mutantes T95 e T12B, quando comparado as linhagens selvagens. No entanto, o mutante T95 foi o que exibiu a maior produção de micélio quando colocado para crescer em meio de cultura líquido Czapeck-Dox suplementado mucigel como única fonte de carbono. Iste fato proporcionou evidências diretas que este mutante foi competente na rizosfera pela suas características ao crescer e metabolizar mucilagem.

Até este ponto, os resultados demonstrados por AHMED & BAKER (1988a,b,c), não esclareciam a correlação entre a resistência ao benomil e a competência na rizosfera. Como todos os mutantes competentes na rizosfera também apresentavam uma aumentada produção de celulase, AHMAD & BAKER (1988c) sugeriram a possibilidade de existir uma estreita ligação os genes reguladores da resistência ao benomil e os da produção de celulase. Entretanto, PETERBAUER *et al* (1992) observaram que, tanto a adição de doses letais de benomil como a transformação para resistência ao benomil, resultavam em aumentos nos índices de celulase e na produção de micélio seco por *T. harzianum* T95 e *T. reesei*, assim como, apresentavam alterações nas  $\beta$ -tubulinas empregadas na montagem dos microtúbulos. O papel dos microtúbulos no transporte vesicular mostrou ser a base para a relação entre a função da  $\beta$ -tubulina e a secreção de celulase (Cleveland & Sullivan, 1985, citados por SULTAN, 1994). Os aumentos das taxas de crescimento micelial e as mudanças na morfologia micelial (pela adição do benomil ou transformação para resistência ao benomil) foram coincidentes com as alterações nas direções dos fluxos das vesículas (PETERBAUER *et al*, 1992). As vesículas têm importante papel na biossíntese das paredes celulares como centro de suplementos, e têm seu transporte controlado pelos microfilamentos e microtúbulos, os quais também governam a polaridade hifal. Assim, alterações no crescimento micelial e/ou produção de celulase estão baseados

no descontrole no fluxo de vesículas (PETERBAUER *et al*, 1992).

Desta forma, a sugestão feita por AHMAD & BAKER (1987) que os mutantes resistentes ao fungicida benomil também possuíam a competência por rizosfera, não foi aceita por PETERBAUER *et al* (1992). Estes autores não acreditaram que o aumento da atividade celulítica fosse a responsável pela rizosfera competência, mas sim que o aumento na taxa de crescimento destes mutantes fosse suficiente para acompanhar a taxa de crescimento da raiz.

As opiniões divergem no emprego de mutações ou outras técnicas genéticas em fungos utilizados no controle biológico de patógenos de plantas. De qualquer modo, cada caso é um caso, e a indução de mutações, embora tenha vantagens para algumas características, é um processo aleatório (AZEVEDO, 1991).

Na agricultura, como já foi comentado, o uso rotineiro de agentes de biocontrole de fitopatógenos ainda não tem sido extensivamente praticado. Uma característica que poderia fazer estes agentes ficarem mais atrativos seria a possibilidade de atuarem como promotores de crescimento de plantas além do controle de patógenos. O potencial de *T. harzianum* em induzir o crescimento de plantas ornamentais e hortícolas tem sido relatado por vários autores, porém os resultados não têm sido consistentes.

CHANG *et al* (1986) utilizando solo natural, observaram uma antecipação de 2 dias na germinação de sementes de pimenta quando comparadas com o controle. Empregando solo pasteurizado ou autoclavados, *T. harzianum* aumentou o número de botões por plantas de crisântemos, petúnias e outros. Entretanto, respostas positivas não ocorreram para todos os casos. Plantas de feijão e rabanete crescendo em solo arenoso vermelho/marrom, não responderam ao *T. harzianum*. Estes resultados divergiram daqueles obtidos por BAKER *et al* (1984), quando observaram 274% de aumento no peso de matéria seca de plantas de rabanete tratadas com o mutante *T. harzianum* T95.

LYNCH *et al* (1991) observaram que os isolados *T. harzianum*

IMI 298374 e *T. harzianum* WT5, quando incorporados (1%, v/v) aos substratos suplementados com melão e levedo de cerveja, exibiram diferenças significativas nas porcentagens de emergência de plântulas a 6 dias, assim como, no peso de matéria seca aos 25 dias. Entretanto, BAKER (1989) obteve apenas um pequeno efeito benéfico na promoção do crescimento das plantas de ervilha e rabanete.

#### 2.4 - *Sclerotinia sclerotiorum* e *S. minor* - Agentes causais da podridão de esclerotínia

Taxonomia, hospedeiros e distribuição geográfica

*Sclerotinia* (Lib) De Bary é membro da Classe Ascomicetos; Sub-Classe Himeoascomicetidae, Ordem Helotiales e Família Sclerotiniaceae (ALEXOPOULOS & MINS, 1979). Os fitopatógenos *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary e *S. minor* Jagger são os agentes causais da podridão de esclerotínia (WILETTS & WONG, 1980). São fungos cosmopolita que apresentam uma grande variabilidade de hospedeiros suscetíveis de importância econômica, sendo que as mais suscetíveis encontram-se entre as famílias Brassicaceae, Compositae, Solanaceae, Umbelliferae, Chaenopodiaceae e Leguminosae. Os hospedeiros de *S. sclerotiorum*, entre plantas cultivadas e plantas daninhas, englobam 64 famílias, 225 gêneros e 383 espécies, e com pequena diferença, são os mesmos para *S. minor* (KOHN, 1979a,b; PURDY, 1979; PARTYKA & MAI, 1962).

Perdas econômicas

A doença tem sido reportada na América do Sul, Europa, Ásia, África e várias regiões da América do Sul (SCHWARTZ & STEADMAN, 1989).

A alface é suscetível tanto a *S. sclerotiorum* quanto a *S. minor* e ambos, através das hifas germinadas de escleródios, podem infectar as partes senescentes das plantas que tocam o



solo. *S. minor* infectam raízes e coroas diretamente pela germinação eruptiva dos escleródios, e um único escleródio pode infectar e matar uma planta. *S. sclerotiorum* frequentemente germina com produção de apotécios, os quais dispersam violentamente os esporos sexuais, os ascosporos. Os ascosporos, provenientes dos apotécios do próprio campo ou de dispersão, são os maiores causadores deste tipo de podridão (BEN-YEPHET *et al*, 1986; PATTERSON & GROGAN, 1985).

A podridão por *S. sclerotiorum* geralmente ocorre durante a maturação das culturas quando expostas à chuvas prolongadas e ao tempo nublado, o que mantém o solo perto da saturação originando um microclima favorável que propicia a formação dos apotécios (Duniway *et al*, 1977, citado por PATTERSON & GROGAN, 1985; ABAWI & GROGAN, 1975, 1979). Em contraste, as infecções de alface por *S. minor* afetam os campos durante todas as estações, mesmo quando *S. sclerotiorum* esta presente (WILLETTS & WONG, 1980). O intervalo de temperatura ótima para o crescimento de *S. minor* e *S. sclerotiorum* é semelhante, variando entre 10 a 25°C, mas a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum* é favorecida pelo limite inferior da temperatura, ou seja, 10 a 15°C. Isto leva a crer que a diferença em relação às flutuações de temperaturas é a razão pela qual *S. minor* predomina em certos campos de produção de alface (IMOLEHIN *et al*, 1980; HAWTHORNE, 1974). Com relação à umidade, a podridão de esclerotínia causada por *S. minor* ocorre consistentemente nos campos infestados, a cada novo cultivo de alface. Em contraste, *S. sclerotiorum* é esporádico e sua ocorrência está associada com prolongados períodos de umidade ambiental. Enquanto que a germinação eruptiva dos escleródios de *S. minor* ocorre até em solos relativamente bem secos, a germinação carpogênica em *S. sclerotiorum*, com posterior formação de apotécios, ocorre somente quando a umidade do solo é mantida próxima da saturação por duas ou mais semanas. Além disso, para que ocorram as infecções pelos ascosporos e se estabelece a

doença é requerida água livre sobre as folhas por cerca de 48 horas ou mais (PATTERSON & GROGAN, 1984). No Brasil, os maiores problemas ocorrem em certas culturas de inverno, na região meridional, e atacando com mais frequência a alface, repolho, couve-flor, brócoli, couve, feijão-vagem e fumo e ocasionalmente, as culturas de chuchu, tomate, berinjela e outras. Nas áreas irrigadas, especialmente de horticultura, podem ocorrer condições favoráveis à doença na maior parte do ano. Em grandes lavouras, predominantemente cultivadas nos meses mais quentes, a incidência da doença não tem sido expressiva no Brasil, havendo contudo regiões com algum histórico de problemas (KISSMANN, 1988).

### Etiologia e epidemiologia

O ciclo vital do patógeno consiste das germinações carpogênica e miceliogênica dos corpos de resistência (WILLETTS & WONG, 1980). As estruturas de resistência formados por uma massa compacta de hifas recobertas por uma camada de células que contém melanina. Em meio de cultura BDA, os escleródios apresentam-se de cor negra, com formato variando do redondo ao semi-esférico, e comprimento de 2-20 mm com diâmetro de 2-10 mm, formando um anel com 20 a 60 escleródios na borda das placas de Petri (WILLETTS & WONG, 1980; LeTOURNEAU, 1979; CHAVES, 1961). A importância dos escleródios esta no fato que constituem aproximadamente 90% do ciclo vital do fungo (ADAMS & AYERS, 1979).

A germinação miceliogênica ocorre com o desenvolvimento de hifas individuais, as quais emergem através do envoltório dos escleródios. Estas hifas parasitam primeiramente a matéria orgânica em decomposição, pois necessitam de uma fonte de nutrientes para crescerem e infectarem os hospedeiros (WILLETTS & WONG, 1980; ADAMS & AYERS, 1979).

A formação dos escleródios pode ser influenciada por vários fatores físicos e nutricionais. Escleródios podem ser

produzidos sob pH variando de 2.5 à 9.0, e sob temperaturas entre 0 até 30°C, com um ótimo de temperatura situando entre 20 e 30°C (Le TOURNEAU, 1979; ABAWI *et al*, 1975).

Os escleródios sobrevivem no solo por 3 a 8 anos (STEADMAN, 1983; ADAMS & AYERS, 1979; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978; COOK *et al*, 1975), entretanto, altas temperaturas do solo e umidade reduzirem significamente o período de sobrevivência (COOK *et al*, 1975). Para ADAMS & AYERS (1979), o pH e textura do solo mostraram ter efeitos mínimos na sobrevivência dos escleródios.

A densidade de inóculo pode aumentar secundariamente pela formação de escleródios secundários, enquanto o aumento primário ocorre pela produção dentro ou sobre o hospedeiro infectado. As plantas daninhas são importante fontes alternativas de inóculo (ADAMS & AYERS, 1979; PURDY, 1979; ABAWI & GROGAN, 1975). Escleródios no solo, entre 1 e 25 cm de profundidade, não necessariamente tornam-se inviáveis. O comprimento do estipe é limitado pela reserva do escleródio. Assim, os escleródios localizados à 3 ou 4cm de profundidade mais frequentemente produzem estipes longas o suficiente para atingir a superfície do solo (ABAWI & GROGAN, 1979; ADAMS, 1975; COOK *et al*, 1975).

Processos os quais levam de *S. sclerotiorum* ao declínio, são parcialmente explicados pelas reduções nas fontes de reservas, devido à formação de apotécios, assim como pela entrada de microrganismos do solo, através das aberturas nas camadas externas decorrentes da germinação carpogênica (MERRIMAN, 1976).

As reduções das reservas de nutrientes também podem ser responsáveis no baixos números de apotécios formados por escleródios localizados entre 4 e 6cm de profundidade no solo. Isto deve-se ao fato das longas estipes formadas necessitarem de nutrientes assim estes deverão ser translocados para a manutenção dos apotécios (MICHELL & WHEELER, 1990).

O número de escleródios de *S. minor* tem sido altamente correlacionado com a severidade da doença, mas não com a incidência de podridão de alface causada por *S. sclerotiorum*. A presença de escleródios de *S. minor* no campo pode assegurar certa ocorrência de podridão. Entretanto, a ocorrência de podridão causada por *S. sclerotiorum* não tem sido consistentemente correlacionada com a presença ou um determinado número de escleródios no campo. De fato, foi observado que perdas por podridão tão altas quanto 70%, ocorreram em campos onde as amostragens do solo não detectaram escleródio de *S. sclerotiorum* (PATTERSON & GROGAN, 1985). Assim, 0.1 à 2 escleródios por Kg de solo podem ser suficientes para uma perda de 4% na produção de alface, ou mesmo gerar uma epidemia, devido ao alto número de ascósporos produzidos por apotécio (SCHWARTZ & STEADMAN, 1978; ADAMS, 1975).

A germinação miceliogênica, para *S. sclerotiorum*, não apresenta-se tão importante como fonte primária de infecção quanto é a produção de apotécio (STEADMAN, 1983; ABAWI & GROGAN, 1979; COOK *et al*, 1975). Os escleródios necessitam superar a dormência para germinar e produzir micélio e/ou apotécios, assim como condições adequadas de umidade relativa e temperatura. Para que a germinação carpogênica, no entanto, os escleródios necessitam ser pré-condicionados em solo úmido e temperatura, entre 4 e 20°C por várias semanas, para alcançarem a maturidade fisiológica (STEADMAN, 1983; Le TOURNEAU, 1979; ABAWI & GROGAN, 1975).

Na germinação carpogênica, os escleródios germinam produzindo os apotécios, onde são formados os ascósporos. Os ascósporos são produzidos em grande quantidade, e quando maduros, são liberados violentamente no ar, disseminados pelo vento sobre hospedeiros susceptíveis (SCHWARTZ & STEADMAN, 1978; ABAWI *et al*, 1975; PURDY & BORDIN, 1953). Os ascósporos, sob condições ambientais favoráveis, germinam emitindo uma hifa infectiva e um novo ciclo de infecção se estabelece (WILLETTS

& WONG, 1980).

A formação de apotécios tem mostrado ser dependente da luz. As estipes, fototrópicas positivas, dependem de comprimentos de ondas de até 390nm para completarem a diferenciação dos discos dos apotécios (STEADMAN, 1983; Le TOURNEAU, 1979; STEADMAN *et al*, 1975).

A germinação carpogênica é influenciada por fatores, como umidade, temperatura, luz, fontes de nutrientes nas quais os escleródios são formados, idade dos escleródios, profundidade no solo, entre outros (PHILLIPS, 1987; WILLETTS & WONG, 1980). O ótimo de temperatura e o período de duração desta, na germinação carpogênica, tem causado grandes contradições entre dos trabalhos publicados, provavelmente devida à ampla distribuição geográfica do patógeno. A habilidade dos escleródios formados à 10°C ou à 25°C, germinarem carpogenicamente, varia entre os isolados e mais especificamente, com a temperatura com que os escleródios foram formados e com a origem geográfica destes isolados (HUANG & KOZUB, 1991). Para estes autores, parece que as condições climáticas da área de origem, mais que o hospedeiro original, determinam a habilidade de um isolado de *S. sclerotiorum* germinar carpogenicamente e causar a doença.

Com a maturação dos apotécios, os ascosporos são liberados entre 2 a 17 dias, com a produção média de  $2.32 \times 10^6$  ascosporos por apotécio, e cerca de 2 apotécios por escleródio. Isto explica porque um baixo número de escleródios no solo pode acarretar uma epidemia (STEADMAN, 1982; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978).

A dispersão dos ascosporos e seu papel na epidemia, dependem do microclima da área de produção. Ascosporos são violentamente lançados pelos apotécios em respostas às mudanças de humidade relativas. Além do importante papel do vento, outras formas de disseminação incluem irrigação, restos de culturas e insetos como as abelhas (STEADMAN, 1983; MORRALL &

DUECK, 1982; ABAWI & GROGAN, 1979).

Para a germinação dos ascosporos são necessárias condições especiais como longos períodos de alta umidade, temperatura entre 10 a 15<sup>0</sup>C e água livre na superfície do hospedeiro (IMOLEHIN *et al*, 1980; HAWTHORNE, 1973). Os ascosporos requerem uma fonte exógena de energia para então infectarem tecidos saudios, as quais são as folhas injuriadas ou senescentes da planta. Após a colonização inicial, o fungo crescerá em direção às partes internas da coroa, matando a planta (ABAWI & GROGAN, 1979).

A sobrevivência de ascosporos não germinados sobre tecidos das folhas ou na superfície do solo é afetada pela umidade relativa, irradiação solar, potencial de água e uma fonte de energia exógena para crescimento micelial (ABAWI & GROGAN, 1975; ABAWI *et al*, 1975; COOK *et al*, 1975; GROGAN & ABAWI, 1975; PURDY & BARDI, 1953).

#### Manejo de controle de *Sclerotinia* sp.

A patogenicidade de *Sclerotinia* spp. é um fenômeno complexo não conhecido adequadamente. A eficiência de *Sclerotinia* spp. como patógeno parece, no entanto, ser dependente de uma complexa combinação de fatores que ocorrem rapidamente na planta hospedeira, antes que esta possa responder (LUMSDEN, 1979).

As plantas hospedeiras, de modo geral, podem ser atacadas em qualquer estágio de desenvolvimento e sob condições de umidade relativamente altas (85-100%) e baixas temperaturas (10-25<sup>0</sup>C). Com um ótimo de 18<sup>0</sup>C, o fungo cresce rapidamente invadindo os tecidos do hospedeiro, no qual uma podridão aquosa se desenvolve e um micélio branco cotonoso cresce sobre os tecidos infectados. Após alguns dias de crescimento micelial, estruturas pequenas e compactas desenvolvem-se tanto na superfície quanto nas cavidades no interior do hospedeiro.

Estas estruturas são os escleródios que estão sendo formados com o avanço da doença, e um grande número destes acumulam-se no hospedeiro. Com a decomposição do hospedeiro, os escleródios serão liberados no solo, onde podem permanecer dormentes por longos períodos, ou podem germinar após o períodos de dormência (DOW *et al*, 1988; IMOLEHIN *et al*, 1980; WILLETTS & WONG, 1980; PURDY, 1979).

Os principais objetivos no controle da doença usando práticas culturais é o de evitar um ambiente cultural propício à infecção e/ou que acarrete aumento da fonte inicial de inóculo. Como exemplo, muitos estudos têm encontrado uma correlação positiva entre a densidade populacional e a incidência da doença. Aumentando o número de plantas por área, ou reduzindo o espaçamento no sistema de plantio, aumentam as possibilidades das plantas sadias serem interceptadas pelo inóculo (BURDON & CHOILVERS, 1980).

As medidas de controle recomendadas para o combate à podridão de esclerotínia, tem sido pouco eficientes (GROGAN, 1979). O controle sobre a irrigação, especialmente quanto à frequência e ao volume aplicado perto do final do plantio, contribuem para reduzir a incidência da doença (STEADMAN, 1979, 1983). As inundações promovem a completa destruição dos escleródios quando o terreno infestado permanecem inundado por períodos longos como 20 a 45 dias. Este método é dificilmente aplicado pois na maioria das situações, tem se mostrado técnica e economicamente inviáveis (CHAVES, 1961).

As práticas de manejo de solo após a colheita que enterram os restos de culturas, parecem reduzir significativamente o número de escleródios sobreviventes entre culturas. No entanto, estes precisam ser profundamente incorporados ao solo por um período mínimo de 30 semanas (MERRIMAN, 1976).

A rotação de cultura visa reduzir o potencial de inóculo no solo, uma vez que escleródios podem sobreviver no solo por 3 a 8 anos. No entanto, a diversidade de plantas hospedeiras

economicamente importante que não sejam suscetíveis, torna difícil o planejamento das rotações (STEADMAN, 1979, 1983; ADAMS & AYERS, 1979; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978; ADAMS, 1975; COOK *et al*, 1975; HAAS & BOLWYN, 1973, 1972).

A disseminação do patógeno através das sementes, com ou dentro destas, tem acarretado opiniões divergentes. ADAMS & AYERS (1979) acreditam que lotes de sementes contaminados com escleródios e/ou micélio são respeitáveis fontes de disseminação, e têm um certo potencial na disseminação à longa distância (ADAMS & AYERS, 1979). Ao contrário, COOK *et al* (1975) e STEADMAN (1983) aceitam que as sementes contaminadas com escleródios e/ou sementes infectadas, têm um papel de pequena importância na disseminação do patógeno. De qualquer forma, a produção e uso de sementes livres da doença é a melhor recomendação para evitar a introdução do patógeno nos campos ou áreas limpas (STEADMAN, 1979).

Fungicidas têm sido usados extensivamente para o controle da podridão por *Sclerotinia* spp., e quando apropriadamente aplicados, reduzem significativamente a incidência da doença (IMOLEHIN *et al*, 1980; MARCUM *et al*, 1977).

Em culturas de alface, o hábito de crescimento da alface dificulta muito o controle químico. Assim, o sucesso do controle químico depende das pulverizações ao tempo certo, mas principalmente, das plantas serem completamente cobertas com o produto. Estes devem ser aplicados antes que ocorram as infecções nos órgãos senescentes, e desta forma, prevenir a colonização nestes partes (VARNER, 1992; STEADMAN, 1979).

Como estratégia para controlar ou reduzir as populações de *S. sclerotiorum*, têm sido recomendadas aplicações foliares de fungicidas foliar, inibidores de germinação e tratamentos de sementes (DICKENS & OSHIMA, 1975; LLOYD, 1975; NATTI, 1971; STEADMAN, 1983, 1988). O controle de *S. sclerotiorum* mostrou-se influenciado pela escolha correta para a início das aplicações e do intervalo entre estas e da fonte de inóculo (ascosporos). Os ascosporos aéreos provenientes de outros



campos, ou, ascosporos carregados por reutilização da água de irrigação, em muito limitam a eficácia das aplicações ao solo e do controle local (PATTERSON & GROGAN, 1985; STEADMAN, 1979).

Os fungicidas como benomil, PCNB e DCNA, inibidores da germinação, têm mostrados parcialmente efetivos para minimizar a podridão de esclerotinia (MARCUM *et al*, 1977; LLOYD, 1974; HAWTHORNE & JARVIS, 1973). Benomil tem sido o fungicida "padrão" usado no controle da podridão por esclerotinia, mesmo não oferecendo uma proteção completa. Várias aplicações do benomil ou DCNA mostram-se necessárias para minimizar a murcha de alface causada por *S. minor* (STEADMAN, 1979). LETHAM *et al* (1976) estudando a biologia e controle de *S. sclerotiorum* observaram que aplicações foliares do benomil a cada 14 dias, em plantas de couve-flor, resultou em um pequeno mas significativo decréscimo da podridão, em um dos anos estudados. LETHAM & STOVOLD (1982), ao testarem 6 fungicidas, em tratamento de escleródios, observaram que tanto benomil como iprodione reduziram as chances de infecções durante a cultura e retardaram a formação dos apotécios por *S. sclerotiorum*. Benomil mostrou-se superior ao iprodione, quanto à habilidade em reduzir a sobrevivência dos escleródios e a germinação carpogênica. Com o emprego do benomil, STEADMAN (1982) obteve controle da podridão, incluindo um aumento na produtividade, quando o índice de severidade da doença foi de até 25%. Para um índice de severidade intermediário, o fungicida ofereceu um controle incompleto, porém com um índice de severidade superior a 60%, o controle foi muito pobre. A falta de controle deveu-se às altas concentrações do inóculo, ascosporos, e às condições climáticas favoráveis que permitiram a rápida colonização pelos ascosporos.

Iniciando bem cedo as aplicações com o fungicida PCNB, STEADMAN (1982) observou que o número de apotécios formados por *S. sclerotiorum* foram reduzidos significativamente sem, no entanto, incorrer em redução da doença. O controle do número de

escleródios não mostrou ser o fator limitante no controle da doença. Por outro lado, quando foi empregado *S. minor*, existiu uma forte correlação entre as populações de escleródios do solo e a incidência da doença. Com a redução do número de escleródios no solo, obteve-se um concomitante decréscimo da doença.

THWIN & MITCHELL (1990) observaram que iprodione e vinclozolin atrasaram a germinação dos escleródios. Vinclozolin mostrou reduzir o número de apotécios por escleródio assim como o número total de apotécios produzidos no ano de 1990. Entretanto, os resultados obtidos para os anos 1989 foram discordantes, provavelmente devido às condições climáticas favoráveis para a germinação carpogênica. Captan e tiofanato metílico têm sido rotineiramente usado para tratamento de sementes e controlado suficientemente o patógeno (TU, 1989).

As variedades de alface comercialmente conhecidas não são resistentes à podridão por esclerotinia (BARROS, 1988). Assim, um método alternativo de controle seria o emprego de antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia* sp.

#### Controle biológico de *Sclerotinia* sp

A podridão de esclerotinia é muito difícil de ser controlada devida à agressividade, dispersão do patógeno e a longa resistência dos escleródios do solo (HUANG, 1980; 1979). Existem porém mais de 30 espécies de fungos e bactérias com efeitos antagônicos ao *Sclerotinia* sp, os quais têm sido observados parasitando escleródios e prevenindo sua formação, ou, reduzindo a germinação carpogênica de *S. sclerotiorum*, acarretando na redução do inóculo no solo. Entre os fungos antagonistas encontram-se: *Trichoderma* sp. (DAVET, 1987); *T. viride* (HOES & HUANG, 1975); *Gliocladium roseum* (PHILLIPS, 1986; MUELLER et al, 1985; TU, 1980); *G. virens* (TU, 1980); *Coniothyrium minitans* (ADAMS, 1989; HUANG, 1980); *Dictyosporium elevans*, *Teratosperma oligocladium* (ADAMS, 1989), *Epicoccum*

*purpurascens* (ZHOU & REELEDER, 1989), *Sporodesmium sclerotivorum* (ADAMS & AYERS, 1982).

As espécies do gênero *Trichoderma*, em especial, têm mostrado certo controle da podridão de esclerotinia, em condições de laboratório, casa-de-vegetação e campo. Um interessante estudos comparativos da sobrevivência no solo, entre escleródios produzidos em meios de cultura e os obtidos de campos de alface, mostrou que a degradação foi mais rápida quando os escleródios estavam naturalmente infestados, indicando que a microflora dos escleródios estavam associadas com a degradação. Com o uso da microscopia eletrônica, foram observadas diferenças estruturais nos anéis dos escleródios, as quais foram relacionadas com as atividades da microflora dos escleródios. Sob condições naturais, os escleródios são formados na presença de outros microrganismos, incluindo hiperparasitas. A consequência são os efeitos adversos na formação dos escleródios resultando em anéis imperfeitos. Perfurações e rachaduras nestes anéis expõem os tecidos esclerotiais mais internos, e atuam como sítios de entrada para os microrganismos associados com a colonização e degradação dos escleródios. Os escleródios produzidos em meio de cultivo e, conseqüentemente, na ausência de outros microorganismos competidores, formaram anéis completos, os quais atuaram efetivamente como camadas isolantes. Estes escleródios, colocados em solos diferentes, proporcionaram evidências da natureza dos fatores influenciando a degradação dos escleródios (MERRIMAN, 1976).

*Trichoderma* ssp., hábeis decompositores têm mostrado serem destruidores de hifas e paredes de escleródios, através da produção de enzimas, como segue. IMOLEHIN & GROGAN (1980) observaram que *Trichoderma* sp., um comum e efetivo micoparasita de escleródios de *S. minor*, foram observados colonizando os escleródios formados nos tecidos de plantas infectadas, em diferente campos da região de Salinas Valley, USA. Esta região é conhecida por ser uma área de intensiva produção de alface e

que apresenta uma relativa eficiência e natural controle biológico da podridão branca.

SANTOS & DHINGRA (1982) constataram que diferentes isolados de *Trichoderma* sp, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *T. harzianum* mataram entre 62-100% dos escleródios de *S. sclerotiorum*, no prazo de 25 dias, *in vitro*. Um dos isolados de *T. koningii* matou 100% dos escleródios dentro de 60 dias, sob condições de campo. Observou-se também uma grande diferença entre os isolados quanto à concentração de conídios por grama de solo com relação ao tempo de incubação, o que mostrou estar positivamente relacionado com o decréscimo no número de escleródios vivos.

MCCREDIE & SIVASITHAMPARAM (1985) ensaiando 12 solos do oeste da Austrália objetivando selecionar fungos destruidores de escleródios, observaram que os 2 isolados de *T. hamatum* e os 3 isolados de *T. harzianum* não demonstraram infectar os escleródios ou alterar a integridade da medula.

ZAZZERINI & TOSI (1985) relataram que, dentre os fungos isolados de solos da região central da Itália e testados *in vitro* para atividade antagônica contra *S. sclerotiorum*, encontravam 1 isolado de *T. viride* e 2 isolados de *T. harzianum*. A microscopia óptica demonstrou alterações no micélio de *S. sclerotiorum* obtida na zona de contato com os antagonistas. Substâncias antibióticas difundidas no meio foram provavelmente as responsáveis pelas alterações morfológicas observadas nas zonas de contato, como: anomalias nas ramificações, granulações, necrose, lises, enrolamento das hifas, e outros. No entanto, foi observada baixa viabilidade de escleródios quando estes foram mergulhados em uma suspensão de conídios  $10^6$ cfu de *Trichoderma* sp.

Os isolados de *T. harzianum* inibiram o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (entre 93-100%) em resposta à produção de antibióticos não-voláteis, assim como reduziram o número de escleródios formados. O autor cita que um agente

ideal de biocontrole seria aquele com habilidade para competir e controlar os patógenos por crescer e ocupar os resíduos infectados, assim como, ter a habilidade de usar estes resíduos como fonte de alimento e a partir da qual crescer, e decrescer as populações de patógenos no solo. Desta forma, foi relatado que 3 dos isolados testados de *T. harzianum* exibiram a habilidade de crescerem sobre a superfície de segmentos de alface, aipo e tomate, e inibirem a formação de escleródios (WHIPPS, 1987).

LYNCH (1987) verificando as atividades de biocontrole de *S. sclerotiorum* por *T. harzianum*, *in vitro*. No teste de cultura pareada, os 2 isolados de *T. harzianum* cresceram completamente sobre o patógeno e inibiram a produção de escleródios. Quando discos-inóculo dos antagonistas e patógeno foram transferidos para tubos contendo solo e 3 plantas de alface, *T. harzianum* IMI275950 foi o mais efetivo dos antagonistas em prevenir a morte das plantas de alface por *S. sclerotiorum*, porém causaram um efeito inibitório da extensão das raízes das plantas sobreviventes. Uma observação importante é que a atividade antagônica foi dependente da taxa do inóculo antagonista e patógeno e da temperatura.

PHILLIPS (1989) relatam fungos antagonistas associados com escleródios de *S. sclerotiorum* na Africa do Sul, obtidos de diferentes culturas e localidades. *T. harzianum* foram isolados apenas dos escleródios provenientes de Nooitgedacht e Madean, porém a viabilidade destes escleródios foi alta (70% e 33%, respectivamente). Estes isolados foram recuperados apenas de escleródios obtidos de raízes (superfície e interior) de plantas de girassol, mas não de escleródios provenientes dos caules. Quando os escleródios foram tratados com suspensão de conídios, *T. harzianum* acarretou na inibição carpogênica e exibiu 0% de apotécios formados.

ADAMS (1989), avaliando a habilidade hiperparasítica de isolados de candidatos à antagonistas, *Trichoderma* sp. entre outros, foi inefetivo em reduzir o número de escleródios

formados quando os escleródios de *S. minor* foram embebido em suspensão de conídios.

KNUDSEN *et al* (1991) observaram, em condições de laboratório, que *T. harzianum* ThIDI formulado como fragmentos miceliais em grânulos de alginato com ou sem farelo de trigo incorporado, colonizaram os escleródios de *S. sclerotiorum* em solo natural ou pasteurizado. As mais altas incidências de colonização ocorreram em solo pasteurizado e à temperatura 25°C.

MUELLER *et al* (1985) usaram uma modificação da técnica de Kohn, depositaram escleródios de *S. sclerotiorum* em placas de Petri contendo vermiculita umidecida e previamente inoculada com um dos agentes de biocontrole à serem testados. Os resultados deste teste diferiram dos demais resultados obtidos no teste de Cultura Pareada, e foram considerados uma prévia para os testes *in vivo* quanto à habilidade antagônica. No teste de cultura pareada, os quando *G. virens* e *T. viride* colonizaram o substrato e cresceram sobre as colônias de *S. sclerotiorum*, enquanto pela modificação de técnica de Kohn, *G. virens* distinguiu dos demais ao reduzir a viabilidade e o número de estipes e/ou apotécios formados por escleródio. O interessante neste estudo foi que o micoparasitismo medido pela taxa de recuperação dos respectivos antagonistas à partir dos escleródios de *S. sclerotiorum* em meio de BDA, não resultou em níveis equivalentes de redução da produção de estipes e/ou apotécios. Os autores sugerem que o parasitismo de escleródios não deveria ser medido pela incidência de recuperação dos agentes de biocontrole dos escleródios, mas sim, pela incapacidade dos escleródios germinarem tanto miceliogênica como carpogenicamente.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - LOCAIS DE INVESTIGAÇÕES

Os ensaios experimentais foram conduzidos nos laboratórios, do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, S.P., Brasil, de Fitopatologia do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental CNPMA/EMBRAPA, Jaguariúna, S.P., Brasil e no laboratório de Controle Biológico de Patógenos de Plantas e casa-de vegetação do Department of Plant Pathology and Weed Science, Colorado State University, Colorado, USA.

#### 3.2 - HOSPEDEIRO TESTE

Na execução dos ensaios experimentais foram empregados como hospedeiro plantas de alface (*Lactuca sativa*).

#### 3.3 - ISOLADOS DE FITOPATÓGENOS E ANTAGONISTAS UTILIZADOS

A origem e características dos isolados e mutantes empregados encontram-se na Quadro 1.

#### 3.4 - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

Quando necessário, o meio de cultura foi suplementado com

os requisitos nutricionais exigidos pelos mutantes auxotróficos.

Quadro 1 - Origem e características dos isolados e mutantes de *Trichoderma* sp. e isolados de *Sclerotinia* sp.

| FUNGOS   | ORIGEM E CARACTERÍSTICAS   |
|--|--|
| <i>T. harzianum</i> TW5                        | isolado originário do Paraná. Doado pelo CNPso/EMBRAPA.  |
| <i>T. harzianum</i> TW5-2B1, TW5-2B2 e TW5-2B6 | mutantes resistente ao fungicida benomil. Obtidos por SILVA (1991) e doado pelo CNPMA/EMBRAPA. |
| <i>T. harzianum</i> WT-T95                     | isolado originário da Colombia. Doado pelo Dr. Baker.  |
| <i>T. harzianum</i> T95                        | mutante resistente ao fungicida benomil e competente em rizosfera. Doado pelo DR. R. BAKER.    |
| <i>T. reesei</i> QM9414                        | mutante celulolítico. Doado pelo Departamento de Genética, ESALQ/USP.                          |
| <i>S. sclerotiorum</i> isolado #1              | isolado originário da região de Guaíra, SP.  |
| <i>S. sclerotiorum</i> isolado #2              | isolado origiário da região nordeste do Colorado, USA. Doado pelo Dr. H.F. SCHWARTZ (CSU/CO).  |
| <i>S. minor</i>                                | isolado originário da região de Mogi-das-Cruzes, SP. Doado pelo CNPMA/EMBRAPA.                 |

#### 3.4.1 - Meio Mínimo (PONTECORVO *et al*, 1953)

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| NaNO <sub>3</sub>                     | 6,00g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 1,50g   |
| KCl                                   | 0,50g   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O | 0,50g   |
| FeSO <sub>4</sub>                     | 0,01g   |
| ZnSO <sub>4</sub>                     | 0,01g   |
| Glicose                               | 10,00g  |
| Ágar                                  | 18,00g  |
| Água destilada                        | 1.000ml |



3.4.2 - **Meio Completo (MC)** (PONTECORVO *et al*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

Meio de cultura Mínimo acrescido de:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Peptona              | 2,00g   |
| Caseína hidrolizada  | 1,50g   |
| Extrato de levedura  | 0,50g   |
| Solução de Vitaminas | 1.000ml |

#### 3.4.3 - **Meio Batata-Dextrose-Ágar**

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Glicose         | 20,00g  |
| Ágar            | 18,00g  |
| Caldo de batata | 1.000ml |

#### 3.4.4 - **Meio de Aveia-Ágar**

|                  |         |
|------------------|---------|
| Dextrose         | 2,00g   |
| Farinha de aveia | 20,00g  |
| Ágar             | 18,00g  |
| Água destilada   | 1.000ml |

#### 3.4.5 - **Meio Extrato de Malte-Ágar**

|                |         |
|----------------|---------|
| Malte          | 10,00g  |
| Peptona        | 10,00g  |
| Dextrose       | 20,00g  |
| Ágar           | 18,00g  |
| Água destilada | 1.000ml |

#### 3.4.6 - **Meio Czapeck-Dox**

|         |        |
|---------|--------|
| Sucrose | 30,00g |
|---------|--------|

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| NaNO <sub>3</sub>               | 3,00g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1,00g   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,50g   |
| KCl                             | 0,50g   |
| FeSO <sub>4</sub>               | 0,01g   |
| Água                            | 1.000ml |

O pH foi ajustado com HCl 1N como necessário.

#### 3.4.7 - Meio Mineral para Microrganismo Celulolítico (MMC) (AMARAL *et al*, 1967, modificado)

|  |         |
|--|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | 7,00g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                  | 2,00g   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .SO <sub>4</sub> | 1,00g   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O             | 0,10g   |
| Extrato de levedura                              | 0,60g   |
| Ágar   | 18,00g  |
| Celulose básica                                  | 100,00g |
| Água destilada                                   | 1.000ml |
| pH   | 5.5     |

As folhas de celulose básica, doadas pela indústria RIPASA, Piracicaba, SP., foram trituradas com o emprego do liquidificador, antes do ágar ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem.

#### 3.4.8 - Solução de Vitaminas

|             |        |
|-------------|--------|
| Biotina     | 0,20mg |
| Riboflavina | 1,00mg |

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Ácido p-aminobenzóico       | 10,00mg  |
| Tiamina                     | 50,00mg  |
| Piridoxina                  | 50,00mg  |
| Ácido nicotínico            | 100,00mg |
| Água destilada esterilizada | 100ml    |

A solução foi esterilizada em banho-maria a 98°C por 28 minutos e guardada em frasco escuro, no refrigerador, sob clorofórmio.

#### **3.4.9 - Solução de Caseína Hidrolisada**

Foi preparada a solução dissolvendo-se 100mg de caseína hidrolisada em 10ml de água destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria a 98°C por 15 minutos e conservada em refrigerador.

#### **3.4.10 - Solução de Extrato de Levedura**

A solução foi preparada dissolvendo-se 50mg de Extrato de Levedura em 10ml de água destilada esterilizada. Esta foi aquecida em banho-maria a 98°C por 20 minutos e mantida em frasco escuro no refrigerador.

#### **3.4.11 - Soluções de Requisitos Nutricionais**

Os estoques das soluções de requisitos (aminoácidos e vitaminas) foram preparados dissolvendo-se cada um dos componentes em 10ml de água destilada esterilizada. Estes foram aquecidos por 20 minutos a 98°C e mantidos em frasco escuro, no refrigerador. (Quadro 2)

**Quadro 2. Requisitos nutricionais e respectivas quantidades diluídas em 10ml de água destilada(FUNGARO,1990)**

|   |         |
|---|---------|
| prolina, arginina, lisina, triptofano, metionina, histidina, isoleucina, glutamina, homoserina, treonina, cisteína, fenilalanina, tirosina, alanina, valina | 100,0mg |
| adenina, uracila, guanina, citosina, timina   | 50,0mg  |
| tiamina, riboflavina, ácido nicotínico  | 1,0mg   |
| ácido p-aminobenzóico, piridoxina   | 0,5mg   |
| biotina   | 0,2mg   |

**3.4.12 - Solução Salina (0,85% p/v)**

|                |         |
|----------------|---------|
| NaCl           | 0,85g   |
| Água destilada | 100,0ml |

**3.4.13 - Solução de "Tween-80" (0,1% v/v)**

|                |         |
|----------------|---------|
| Tween-80       | 0,85ml  |
| Água destilada | 99,15ml |

**3.4.14 - Solução de Desoxicolato de Sódio (10% p/v)**

|                       |         |
|-----------------------|---------|
| Desoxicolato de sódio | 10,00g  |
| Água destilada        | 100,0ml |

**3.4.15 - Solução de HCl 1N**

|                 |         |
|-----------------|---------|
| HCl concentrado | 82,50ml |
| Água destilada  | 1.000ml |

**3.4.16 - Soluções-Estoque de Fungicidas**

**3.4.16.1 - Benomil**

Foi usado o químico-ativo do fungicida comercial Benlate (50% do princípio ativo), ou seja, benomil: 1-(butilcarbamoil)-2-benzionidazol carbomato de metilo, Du Pont. A solução foi preparada pela técnica de EDGINTON *et al* (1971), modificada por MENTEN *et al* (1976), dissolvendo-se o produto em acetona (5,0 ml) e completando-se o volume para 100 ml com água destilada esterilizada (solução estoque). A partir desta solução foram feitas diluições em série transferindo-se uma alíquota de 1,0 ml de cada suspensão para 100 ml de meio de cultura fundente, de maneira a obter-se as concentrações desejadas.

#### 3.4.16.2 - Iprodione

Foi usado o químico-ativo do fungicida comercial Rovral (50% do princípio ativo), ou seja, iprodione: 3-(3,5-diclorofenil)-N-(1-metil-letil)-2,4-dioxo-1-imidazolina carboximida, Rhône-Poulenc Ag. Co. A técnica de preparo foi a mesma descrita no item 3.4.16.1.

### 3.5 - MANUTENÇÃO E PREPARO DOS INÓCULOS

O inóculo dos mutantes de *T. harzianum* TW5 consistiu de discos de meio de cultura contendo micélio e conídios jovens ou suspensão de esporos, obtidos de placas de Petri contendo meio de BDA, e mantidas à temperatura ambiente, sob regime de luz constante. O inóculo à ser repicado foi retirado, preferencialmente, das bordas das colônias através de um cortador de metal de 0,5 cm de diâmetro. O inóculo de *S. sclerotiorum* e *S. minor* seguiu a metodologia acima descrita, exceto que o inóculo a ser repicado foi retirado, obrigatoriamente, das bordas da colônia, ou, o inóculo consistiu de escleródios obtidos de placas de petri contendo meio de BDA ou Aveia, incubadas por 45 dias à 22°C.

Estas linhagens foram estocadas em tubos de ensaio contendo os respectivos meios de cultura (tubo inclinado) e conservados no refrigerador. Para os isolados de *S. sclerotiorum* e *S. minor*, os escleródios foram usados como estoque a longo-termo.

### 3.6 - OBTENÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS ATRAVÉS IRRADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Uma suspensão de conídios de *T. harzianum* TW5, estimada através do uso da câmara de Neubauer em  $10^7$  conídios por ml, foi diluída para a concentração de  $10^6$  conídios por ml. O volume de 10 ml dessa suspensão de conídios foi colocada em uma placa de Petri esterilizada à distância de 17 cm da fonte de luz ultravioleta (253nm, marca Mineralight - 115 volts, da Ultra-Violeta Prod. Inc., San Gabriel - Califórnia - USA) por 3 minutos, em ambiente escuro (SILVA, 1991). Alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas contendo meio Completo suplementado com 0,1% de desoxicolato de sódio, e incubadas a 25°C por 48 e 72 hs. Todo o processo de irradiação e plaqueamento do material foi realizadas no escuro e, as placas foram protegidas por papel opaco durante as primeiras 24 horas de crescimento.

#### 3.6.1 - Mutantes obtidos através do Isolamento Total

As colônias resultantes de conídios irradiados foram transferidos uma a uma para placas de Petri contendo meio Mínimo suplementado com 0.1% de desoxicolato de sódio (26 pontos). Após 48 horas de incubação, os pontos que receberam pedaços das colônias que não cresceram, foram recortados e os blocos de ágar foram transferidos para placas de Petri contendo meio Completo. Após 72 horas de incubação, conídios destas colônias foram novamente transferidos para placas de Petri contendo meio Mínimo e, não havendo

crescimento, as colônias foram considerados como mutantes auxotróficos.

Os mutantes morfológicos foram selecionados através da observação visual da morfologia das colônias.

### 3.6.2 - Mutantes obtidos através de Enriquecimento por Filtração

Após tempo apropriado de irradiação, 1,0 ml da suspensão de conídios foi transferida para erlenmeyer (250 ml) contendo 50 ml de meio Mínimo líquido por 20 horas, a 25°C com agitação. Após este período, o meio de cultura foi filtrado por 8 camadas de gazes arranjadas em um funil de porcelana, coletado em erlenmeyer e incubado a 25°C sob agitação. Este procedimento foi repetido duas vezes, sendo que o volume do último filtrado foi centrifugado à aproximadamente 2.900g por 15 minutos. O precipitado foi ressuscitado e diluições apropriadas foram semeadas em meio Completo mais 0,1% de desoxicolato de sódio. As colônias emergentes foram transferidas uma a uma, com auxílio de palitos esterilizados, para placas contendo meio Mínimo mais 0.1% desoxicolato de sódio (26 pontos). Após 48 horas de incubação, os pontos que não cresceram foram transferidos em blocos de ágar para meio Completo. Após 72 horas de incubação, os conídios dessas colônias foram transferidos novamente para meio Mínimo, e não havendo crescimento, as colônias foram consideradas como sendo provenientes de mutantes auxotróficos.

Para o ensaio das deficiências nutricionais, conídios dos mutantes auxotróficos foram transferidos (26 pontos) para placas de Petri contendo Meio Mínimo sólido mais desoxicolato de sódio (0,1%) e suplementadas (0,1ml por placa) com soluções de caseína hidrolisada, extrato de levedura ou vitaminas, separadamente. O material foi inoculado e incubado por 48-72 horas. O crescimento de cada linhagem, em uma ou mais das

soluções, foi usado como indicativo da(s) deficiência(s), o que foi seguido de ensaios para cada um dos componentes da(s) solução(s) individualmente (Quadro 2).

### 3.6.3 – Teste de Reversão

Discos de meio contendo micélio dos mutantes foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de BDA. Após 3 dias, discos contendo micélio destas colônias foram transferidos para novas placas de Petri contendo o meio de cultura semelhante. O procedimento foi repetido 7 vezes, sendo que na última vez o material foi deixado incubado por 12 dias para que fosse possível obter-se suspensões de conídios, como auxílio da solução Tween 80, nas concentrações de  $10^7$ – $10^8$  conídios por ml. Destas soluções, 0,1ml foram plaqueadas em Meio Mínimo. Os mutantes com duas ou mais deficiências tiveram adicionado ao Meio Mínimo, separadamente, cada um com respectivos suplementos. O crescimento das colônias foi verificado após 120 horas de incubação a 25°C.

Cada tratamento contou de 3 ou 4 repetições, o experimento foi repetido duas vezes, e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.7 – VERIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO RADIAL E ESPORULAÇÃO DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 NOS MEIOS DE CULTURA BDA E AVEIA.

A inoculação foi feita através da transferência de discos de meio contendo micélio para o centro das placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura. As avaliações do crescimento micelial (cm) ocorreram aos 24, 48, 72 e 96 horas de crescimento à 25°C sob luz constante.

Após as avaliações do crescimento radial, o material foi reincubado por mais 7 dias. Suspensões de conídios foram



preparadas lavando as superfícies das colônias com ajuda de 10ml de solução Tween 80. As soluções foram vigorosamente agitadas após serem recolhidas aos tubos de ensaio, e realizou-se diluições em série apropriadas. A avaliação deu-se pela contagem do número de conídios, com o uso da câmara de Neubauer.

Cada tratamento constou de 3 repetições e o delineamento experimental foi o de fatorial ao acaso.

### 3.8 - TESTE DE ANTIBIOSE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5 CONTRA *S. sclerotiorum* #1, *in vitro*.

O método consistiu em se cobrir assepticamente a superfície das placas de Petri contendo meio de Extrato de Malte, com discos de papel celofane (10cm de diâmetro). A seguir, discos de meio contendo micélio dos mutantes de *T. harzianum* TW5 foram transferidos para o centro das placas, sobre a superfície do papel celofane (DENNIS & WEBSTER, 1971a). O material foi incubado à 25°C, sob luz constante, até que atingissem cerca de 6 cm de diâmetro, quando o papel celofane foi retirado. Posteriormente, um disco de meio contendo micélio do isolado *S. sclerotiorum* #1 foi transferido para o centro de cada placa e o material foi incubado à 25°C, na ausência de luz, por 120 horas. Cada placa de Petri conteve rigorosamente 20 ml do meio de cultura. Observou-se o diâmetro de crescimento das colônias, comparando-os com a testemunha crescida em ausência de *T. harzianum*. A porcentagem de redução do crescimento micelial foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{cresc. testemunha} - \text{cresc. tratamento}}{\text{crescimento testemunha}} \times 100$$

Cada tratamento consistiu de 5 repetições e o experimento foi repetido duas vezes. O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado.

### 3.9 – TESTE DE ANTAGONISMO EM CONFRONTRAÇÃO DIRETA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5 CONTRA *S. sclerotiorum* #1, *in vitro*.

Empregando o Teste de Cultivos Pareados (BELL *et al*, 1982), discos de meio contendo micélio do patógeno foram transferidos para placas de Petri (9cm de diâmetro) contendo meio de BDA, a uma distância de aproximadamente 1,0 cm do bordo. Este material foi incubado à 25°C por 24 horas, na ausência de luz. A seguir, foi feita a transferência dos discos de meio contendo micélio dos antagonistas para as placas, porém em posição oposta à colônia do patógeno. O material foi incubado durante 120 horas à 25°C em ausência de luz.

Um critério de avaliação seguiu a metodologia proposta por WIJETUNGA *et al* (1984), a qual consistiu da mensuração do crescimento das colônias do fitopatógeno no momento em que as colônias, nas placas-testemunhas, ocuparam o diâmetro total da placa de Petri. Para o cálculo da porcentagem de redução do crescimento (RC) usou-se a fórmula:  $RC = (CTA - CTP) / CTA \times 100$ , onde CTA significou crescimento total da colônia na ausência do antagonista e, CTP, o total de crescimento da colônia na presença do antagonista.

As avaliações por notas foram baseadas no critério de BELL *et alli* (1982). A escala de notas variou de 1 a 5, qual seja: o valor 1 foi atribuído quando o antagonista invadiu completamente o patógeno e colonizou todo o substrato; 2, quando o antagonista invadiu pelo menos 2/3 da superfície do meio; 3, quando o antagonista e o patógeno colonizaram, ambos, metade da superfície do meio; 4, o patógeno colonizou no mínimo 2/3 da superfície do meio e este pareceu se opor ao antagonista; e finalmente o valor 5, quando o patógeno invadiu completamente o antagonista e ocupou toda a superfície do meio.

Deste mesmo material, após 10 dias de incubação, foram anotados os números de escleródios formados.

Cada tratamento consistiu de 5 repetições e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.10 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPERPARASÍTICA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5 E SOBRE ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* #1, *in vitro*.

Discos de meio contendo micélio do patógeno foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo meio de BDA. O material foi incubado à 25°C até que escleródios fossem formados (aproximadamente 20 dias). A seguir, discos de meio contendo micélio dos candidatos à antagonistas foram transferidos para o centro das placas e ao lado do disco-inóculo do patógeno. O material foi incubado por 15 dias à 25°C.

Para os ensaios foram usados os escleródios recuperados das placas acima preparadas. Dois diferentes métodos de desinfestação de superfície foram empregados, quais sejam: 1, os escleródios foram vigorosamente lavados em hipoclorito de sódio (10%) por três minutos; 2, os escleródios foram vigorosamente lavados na mistura de hipoclorito de sódio (10%) por um e meio minutos e posteriormente em álcool (70%) por um e meio minutos. Após, os escleródios foram enxaguados duas vezes em água destilada esterilizada, deixados secar sobre papel de filtro esterilizado, para então serem transferidos para placas de Petri contendo BDA suplementado com Rosa de Bengala (0,033g/l). O material foi incubado por 120 horas à 25°C, na presença de luz. Avaliação deu-se pela presença de colônias dos candidatos à antagonista crescendo no meio de cultura ao redor dos escleródios.

Para o primeiro método, cada tratamento constou de 5 repetições contendo 9 escleródios cada, e para o segundo

método, cada tratamento constou de 4 repetições contendo 10 escleródios cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.11 – TESTE DE SENSIBILIDADE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5 AO FUNGICIDA BENOMIL, *in vitro*.

De colônias previamente crescidas por 4 dias, discos de meio contendo micélio foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio de BDA suplementado com o fungicida benomil nas concentrações 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 e 1000ppm (preparados segundo o ítem 3.4.16.1). O material foi incubado por 6 dias à 25<sup>0</sup>C sob luz constante. A medida do diâmetro das colônias foi efetuada no momento em que as colônias-testemunhas (tratamento na dose 0ppm do fungicida) apresentaram seu crescimento máximo. As avaliações consistiram do cálculo da porcentagem da redução do crescimento das colônias (RC%), utilizando-se a fórmula:  $\% RC = (DP - CTF)/DP \times 100$ , onde: DP significou o diâmetro da placa da Petri (9cm) e CTF significou o total de crescimento das colônias (cm) nos tratamentos.

Após as medições, as placas foram mantidas por mais 6 dias à 25<sup>0</sup>C sob luz constante. As suspensões de conídios foram preparadas lavando as superfícies destas colônias com ajuda de 10ml de solução Tween 80. As soluções foram recolhidas aos tubos de ensaio e vigorosamente agitadas. A avaliação deu-se pela contagem do número de conídios com o uso da câmara de Neubauer.

Cada tratamento constou de 3 repetições e o delineamento experimental foi fatorial ao acaso.

### 3.12– SELEÇÃO EM PLACA PARA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5, PELO MÉTODO SEMI-QUANTITATIVO.

Foram empregadas placas de Petri contendo meio de cultura acrescido de celulose (ítem 3.4.7) e suplementado com desoxicolato sódio (0,2%). A inoculação de mutantes de *T. harzianum* TW5 deu-se transferindo discos de meio contendo micélio para 3 pontos equidistantes da placa de Petri, as quais foram mantidas por 5 dias à 25°C. Este material foi submetido a um choque térmico de 50°C durante 12 horas, para a revelação do halo de degradação. A atividade enzimática foi expressa pela área total de degradação, obtida pela fórmula: área do halo =  $\pi / 4 \times (D^2 - d^2)$ , onde:  $D^2$  significou o diâmetro da colônia mais o halo e  $d^2$  significou o diâmetro da colônia. Como isolado-padrão foi usado o mutante *T. reesei* QM9414.

Cada tratamento constou de 3 repetições contendo três colônias cada, e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.13 - TESTE DE SENSIBILIDADE DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 EM RELAÇÃO AOS FUNGICIDAS IPRODIONE E BENOMIL, *in vitro*.

Para o primeiro teste foi observado o crescimento micelial dos mutantes e linhagens selvagens em meio de BDA suplementado com o fungicida iprodione na concentração 500ppm, o qual foi acrescentado ao meio de cultura minutos antes deste ser vertido. De colônias previamente crescidas por 4 dias, discos de meio contendo micélio foram transferidos para o centro das placas de Petri. O material foi incubado por 6 dias à 25°C sob luz constante. A medida do diâmetro das colônias em crescimento foi efetuada no momento em que as colônias-testemunhas (tratamento na dose 0ppm do fungicida) atingiram o crescimento máximo. As avaliações consistiram do cálculo da porcentagem de redução do crescimento das colônias (RC%), utilizando-se a fórmula:  $\% RC = (DP - CTF) / DP \times 100$ , onde: DP significou o

diâmetro da placa da Petri (9cm) e CTF significou o total de crescimento das colônias (cm) nos tratamentos.

Cada tratamento constou de 3 repetições e o delineamento experimental foi o de fatorial ao acaso.

Para este teste de sensibilidade ao fungicida benomil, o meio de cultura líquido Czapeck-Dox, contendo glucose 2%, foi diluído 50% e o pH ajustado para 4,0 com HCl 1N. Meio de cultura (50ml) foi transferido para erlenmeyers de 125ml de capacidade. O fungicida foi pesado e acrescentado a cada um dos erlenmeyers separadamente antes de serem autoclavados, de forma a obter-se as concentrações desejadas: 0, 10, 21, 47, 100, 215, 470 e 1000ppm para os mutantes, e 0, 0.1, 0.21, 0.47, 1.0, 2.15, 4.7 e 10.0ppm para as linhagens selvagens. A inoculação, através de suspensões de conídios, permitiu obter a concentração final de  $10^5$  conídios por ml. O material foi mantido por 10 dias 25°C sob agitação constante. O micélio formado e recolhido em papel de filtro com o auxílio de um funil de porcelana acoplado à uma bomba à vácuo, foi lavado duas vezes e levado à secadora por 5 dias à 60°C, para então serem pesados. O papel de filtro recebeu tratamento prévio de secagem e pesagem, de tal forma que a diferença final pudesse ser considerada o peso de matéria seca produzido.

O experimento foi realizado 8 vezes contendo 1 repetição de cada tratamento por vez, e o delineamento experimental foi fatorial em blocos ao acaso.

### 3.14 - VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO MICELIAL DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 EM RELAÇÃO ÀS DIFERENTES FONTES DE CARBONO, *in vitro*.

As seguintes fontes de carbono foram empregadas: laminarina (*Laminaria digitata* - United States Biochemical Co., Ohio), quitina não-tratada (ICN-Pharmaceuticals, Ohio), e fibras de algodão moída, carboxi-metil celulose (baixa

viscosidade), celobiose, celulose microcristalina (tipo 20) e glucose (da Sigma Chemical Co). Para a fonte de carbono Laminarina, erlenmeyers (25ml) foram preenchidos com 9.9ml do meio de cultura líquido Czapeck-Dox (pH 5,8) sem sucrose e suplementado com laminarina 2%. Para as demais fontes de carbono, erlenmeyers (250ml) foram preenchidos com 49ml do meio de cultura líquido Czapeck-Dox (pH 5,8) sem sucrose e suplementado com 2% das fontes de carbono. Após serem autoclavados, os frascos receberam 0.1ml das correspondentes suspensões de conídios dos mutantes, de forma a obter-se a concentração final de  $10^5$  u.f.c/ml. O material foi incubado por 8 dias sob agitação constante à 25°C. O micélio formado foi recolhido ou através do uso de um funil de porcelana, enxaguada, coletada com o auxílio de uma pinça e depositado sobre o papel de filtro, ou, o micélio foi recolhido em papel de filtro com auxílio de um funil de porcelana acoplado a uma bomba à vácuo. O material coletado foi enxaguado 2 vezes e levado à incubadora por 5 dias à 60°C, para então serem pesados. O papel de filtro utilizado recebeu prévio processo de secagem e pesagem, de tal forma que a diferença final pudesse ser considerada o peso de matéria seca produzido.

Os experimentos utilizando as fontes de carbono Laminarina ou Celobiose foram repetidos 3 vezes contendo 2 repetições de cada tratamento por vez. Para a fonte de carbono quitina, o experimento foi repetido 4 vezes contendo 1 ou 2 repetições de cada tratamento por vez e, para as demais fontes de carbono, o experimento foi repetido 6 vezes contendo 1 repetição de cada tratamento por vez. O delineamento experimental foi fatorial em blocos ao acaso.

### 3.15 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPERPARASÍTICA DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 SOBRE OS ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* #1, *in vitro*.

Discos de meio contendo micélio dos patógenos foram transferidos para o centro das placas de Petri contendo meio de BDA, e material foi incubado por 24 horas à 25°C. A seguir, discos de meio contendo micélio dos candidatos à antagonistas foram transferidos para as placas de Petri, como segue: para três pontos equidistantes à aproximadamente 1.0cm de seus bordos, ou, sobre as colônias dos patógenos e exatamente ao lado dos discos-inóculo. Este material foi incubado durante 120 horas à 25°C. As avaliações foram feitas através da contagem do número de escleródios formados. Para avaliação de uma possível atividade hiperparasítica dos mutantes sobre os escleródios formados, estes foram recolhidos das placas acima descritas, lavados rigorosamente em hipoclorito de sódio (10%) mais álcool (70%) três vezes por um total de dois minutos, enxaguados duas vezes em água destilada, e deixados secar sobre papel de filtro esterilizado. Para testar os mutantes quanto à atividade hiperparasítica sobre escleródios, os escleródios lavados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de BDA suplementado com Rosa de Bengala (0,03%), para placas de Petri contendo papel de filtro umidecido e esterilizado, ou para placas de Petri de vidro contendo fatias de cenoura sobre papel de filtro umidecido (10 por placa). Antes de serem fatiadas, as cenouras foram emergidas em hipoclorito de sódio 10% por 3 minutos, para desinfecção de superfície. Os escleródios, partidos ao meio, tiveram as metade transferidas para as duas placas de Petri, em posições correspondentes. O material foi incubado por 120 horas à 25°C, para então serem avaliados quanto à presença de colônias do patógeno crescendo sobre o substrato, ao redor dos escleródios.

Para o experimento empregando meio de BDA, cada tratamento constou de 4 repetições contendo 10 escleródios por placa (exceções para TW5-410, com 6 escleródios por placa, e para TW5-523, com 9 escleródios por placa), e o experimento foi repetido 2 vezes. Quando o experimento empregando papel de



filtro umidecido ou fatias de cenoura sobre papel de filtro umidecido, cada tratamento constou de 1 repetição constituída de duas placas de Petri contendo cada uma as correspondentes metades de 10 escleródios. O delineamento experimental foi o de inteiramente casualizado.

O comportamento hiperparasítico dos mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1 e 2 foi reavaliado empregando uma segunda metodologia. Para tanto, foram usadas placas de Petri de vidro (10 cm de diâmetro) contendo vermiculita mais farelo de trigo (0,01%) umidecidos e autoclavadas por 45 minutos. Escleródios, provenientes de meio de Aveia e com 5 dias velhos, foram lavados em hipoclorito de sódio (10%) por 2 minutos, enxaguados em água destilada esterilizada, deixados secar sobre papel de filtro esterilizado, e transferidos para a superfície da vermiculita. A pré-inoculação dos mutantes deu-se através da transferência de 0,5 ml das suspensões de conídios ( $10^6$  conídios por ml) por placa. As placas foram seladas usando parafilme, e mantidas à 22°C por 15 dias. Após serem recuperados, os escleródios foram novamente lavados, como descrito anteriormente, e transferidos tanto para placas de Petri contendo meio de BDA suplementado com Rosa de Bengala (0.03%) como para placas de Petri contendo fatias de cenoura papel depositadas sobre papel de filtro umidecido. O material foi incubado por 5 dias à 22°C. A avaliação deu-se pela porcentagem de escleródios viáveis, isto é, pela verificação de micélio do patógenos crescendo ao redor dos escleródios.

Para o primeiro método, cada tratamento constou de 20 escleródios divididos em 3 repetições, e para o segundo método descrito, cada tratamento constou de 3 repetições sendo cada uma constituída das duas placas de Petri contendo as correspondentes metades de cada escleródio (10 por placa). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

**3.16 – COMPORTAMENTO ANTAGÔNICO DE MUTANTES DE *T.harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95, CONTRA *S. sclerotiorum* # 1 E *S. minor*, SOBRE SEGMENTOS DE AIPO, *in vitro*.**

Os caules de aipo tiveram a superfície desinfestada com hipoclorito de sódio (10%) por 3 minutos, antes de serem cortados em segmentos de 8 cm de comprimento. Cada segmento teve a superfície danificada nas duas extremidades e a 2 cm dos bordos, sem que pedaços fossem retirados, empregando um cortador de rolhas. Estes segmentos foram transferidos, 2 a 2, para placas de Petri (14cm de diâmetro) contendo perlita previamente umidecida e autoclavada por 45 minutos. Para a superfície do aipo, e lado à lado repartindo a área danificada, foram transferidos discos-inóculo do mutante e do patógeno. Este material foi mantido a 22°C por 5 dias. A avaliação foi realizada através da mensuração do tamanho das lesões provocadas pelos patógenos e pelo número de escleródios formados.

Discos de aipo (0,5cm de diâmetro) autoclavados por 20 minutos, foram transferidos para a superfície das colônias dos mutantes ou dos patógenos, crescendo por 2 dias em meio de BDA. Estes foram deixados serem colonizados por 3 dias, para então serem utilizados como discos-inóculo.

Cada tratamento constou de 4 repetições sendo cada uma a média de 4 lesões, e o experimento foi repetido duas vezes. O delineamento experimental foi fatorial ao acaso.

Um novo teste foi realizado para observar a influência do tempo de inoculação dos patógenos no comportamento antagônica de mutante de *T. harzianum* WT-T95. O procedimento foi o mesmo acima descrito, exceto que os discos-inóculo do patógeno foram transferidos ao mesmo tempo que os discos-inóculo do mutante de *T. harzianum* WT-T95, ou após 12, 24 e 36 horas.

Cada tratamento constou de 4 repetições sendo que cada uma constituída da média de 4 lesões, e o delineamento experimental

foi fatorial ao acaso.

**3.17 - COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE *T. harzianum* WT5 E *T. harzianum* WT-T95 SOBRE ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* #1 E *S. minor*, EM VASOS CONTENDO SOLO NATURAL E PLANTAS DE ALFACE, *in vivo*.**

Os vasos plásticos (15x17 cm) foram preenchidos com solo originário do perímetro rural da cidade Nunn, Estado de Colorado, USA. Para o preparo do inóculo de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, uma mistura de serrapilheira, farelo de trigo e água (1:1:1) foi colocada em jarros de vidro (para aproximadamente 1kg). Estes foram fechados com algodão e autoclavados por 45 minutos, por 2 dias consecutivos. Discos de meio contendo micélio dos mutantes foram transferidos para os jarros. O material foi mantido à 25°C por 4 semanas, deixados secar por uma semana, espalhados sobre formas de alumínio cobertas com papel, e moídos no Micro-Mill usando o separador de aberturas de 2mm de diâmetro (Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio). O número de unidades formadoras de colônias (cfu) por grama de substrato foi determinado por plaqueamento em série em meio de BDA mais Rosa de Bengala (0.03%) e suplementado ou não com 100ppm do fungicida benomil. A inoculação deu-se misturando vigorosamente o inóculo ao substrato, antes dos vasos serem preenchidos, de forma a obter-se 10<sup>5</sup> u.f.c. por grama de substrato.

Os escleródios, obtidos de placas de Petri contendo Meio de BDA e com 1 mês de idade, foram lavados com hipoclorito de sódio 10% por 2 minutos, enxaguados 2 vezes em água, deixados secar sobre papel de filtro, para então 2 e 3 escleródios de *S. sclerotiorum* e *S. minor*, respectivamente, serem transferidos para os vasos, e depositados cerca de 1cm das plantas e a 1cm de profundidade. As plantas de alface (cultivar Grand Rapids, Henry Fields Seeds Co.), foram transplantadas 15 dias antes da

inoculação do patógeno. Os experimentos foram mantidos por aproximadamente 35 dias à 20-25°C. As plantas foram mantidas cerca de 30 dias à 22-24°C. A avaliação deu-se pela contagem do número de plantas sobreviventes.

Para o experimento com o isolado de *S. sclerotiorum*, cada tratamento constou de 6 repetições, enquanto para o experimento com o isolado de *S. minor*, cada tratamento constou de 5 repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.18 - INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 NA PRODUÇÃO DE ESTIPES E/OU APOTÉCIOS FORMADOS POR *S. sclerotiorum* # 1 E 2, *in vitro*.

Foram usadas placas de Petri de vidro (9x10cm de diâmetro) contendo vermiculita mais 0.01% de farelo de aveia umidecido, previamente autoclavadas por 45 minutos. Escleródios com 60 dias de idade, obtidos e tratados como descritos no item 3.17, foram transferidos para a superfície da vermiculita. A inoculação dos mutantes deu-se distribuindo 0,5ml das suspensões de conídios pela superfície da vermiculitana, concentração  $10^6$  conídios por ml. As placas foram vedadas com parafilme e mantidas à 20-22°C por 45 dias. A avaliação deu-se pela contagem do número de estipes e/ou apotécios formados por escleródio, com auxílio de microscópio estereoscópio.

Cada tratamento constou de 4 repetições com 10 escleródios cada. O experimento com o isolado *S. sclerotiorum* # 2 foi repetido 2 vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.19 - INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 SOBRE ESTIPES E/OU APOTÉCIO DE *S. sclerotiorum* # 2, FORMADOS E TRATADOS EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO, E A SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE ALFACE.

Foram empregados escleródios de *S. sclerotiorum* # 2, recolhidos de placas de Petri contendo meio de Aveia, e o experimento foi conduzido como descrito no ítem 3.18, porém na ausência dos mutantes. Os escleródios, agora exibindo estipes e/ou apotécios, foram cuidadosamente transferidos para outra placas de Petri de vidro (14cm de diâmetro), igualmente preparada, porém pré-inoculadas com os mutantes, como já descrito. As placas foram seladas com parafilme e o material foi mantido por 7 dias à 22-24°C. Os escleródios foram então transferidos para a superfície dos vasos à 1cm de profundidade e 1cm de distância das plantas. Os vasos (9X10cm) foram preenchidos com uma mistura de serrapilheira e perlita (3:1) e as plantas de alface com 15 dias de idade (cultivar Grand Rapids, Henry Fields Seeds, Co.), foram transplantadas uma semana antes dos escleródios serem transferidos. Após 45 dias, as plantas foram cortadas, e a avaliação deu-se pela contagem do número de estipes e/ou apotécios na superfície dos vasos.

Cada tratamento constou de 6 repetições contendo 3 plantas por vaso e 2 escleródios por planta, e o experimento foi repetido 2 vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Para o segundo experimento, o prepara e tratamento dos escleródios, vasos e a inoculação deu-se como descrito acima. Cada vaso assim preparado foi colocado dentro de um saco plástico (30 x 30cm - Ziploc, Gripper Zipper Dow Brands L.P), e mantido sob luz constante à 20-22°C. A cada 2 dias, os sacos plásticos foram rapidamente abertos, com o objetivo de imitar o vento e auxiliar na dispersão dos ascosporos. Após este período, os sacos plásticos foram retirados e os vasos transferidos para casa-de-vegetação, onde permaneceram por 15 dias. A avaliação deu-se pela contagem do número de plantas sobreviventes.

Cada tratamento constou de 7 repetições contendo 3 plantas por vaso e 2 escleródios por planta, e o experimento foi

repetido 2 vezes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

**3.20 - INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 NO NÚMERO DE ESTIPES DE *S. sclerotiorum* # 1 E 2, NA PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, *in vivo*.**

Os vasos de plástico (9x10cm), com capacidade para 40g do substrato, foram preenchidos com uma mistura contendo serrapilheira e perlita (3:1) acrescidos com 10% do composto Strong-Lite (constituído por biocomposto de casca de pinheiros, serrapilha, *Sphagnum canadense*, vermiculita, perlita, agente umidificante, produzido pela Horticultural Products, Zeneca, Il), pH 4,5. O preparo dos inóculos e inoculação dos mutantes deu-se com descritos no item 3.18. Os escleródios foram distribuídos pela superfície dos vasos e depositados cerca de 1cm de profundidade. Após 24 horas da inoculação, 40ml das suspensões dos fungicidas foram usados para regar os vasos. O fungicida benomil e iprodione foram preparados nas concentrações de 1000 e 500ppm, respectivamente. A avaliação deu-se pela contagem do número de estipes formadas por escleródio, com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

O experimento constou de 3 repetições, sendo que para o isolado # 1 foram avaliados 10 escleródios por vasos e, para o isolado # 2, foram avaliados 8 escleródios por vaso. O experimento foi repetido 2 vezes e o delineamento experimental foi atorial em blocos ao acaso.

**3.21 - INFLUÊNCIA DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 SOBRE ESCLERÓDIOS DE *S. sclerotiorum* #2, EM PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, E A SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE ALFACE, *in vivo*.**

Foram usados vasos plásticos (9x10cm) com capacidade para 40g do substrato, os quais foram preenchidos com uma mistura de

serrapilheira e perlita (3:1), acrescidos com 10% do composto à base de restos de cultura de algodão e de indústria de papel (Cotton Burr Compost, Back to Earth Resources Inc., Texas), pH 5.0.

O preparo do inóculo e inoculação dos mutantes e de *S. sclerotiorum* #2 foram realizados como descritos no item 3.20. Os escleródios foram depositados à 1cm de profundidade e a cerca de 1cm de distância das plantas de alface (da Rock Ford Seeds Co). Após 24 horas da inoculação, 40 ml das suspensões dos fungicidas foram usados para regar os vasos. O fungicida benomil e iprodione foram usados nas concentrações 1000 e 500ppm, respectivamente. As plantas de alface foram transplantadas 15 dias antes da inoculação do patógeno. Aos 40 dias da montagem do experimento, foi avaliado o número de plantas sobreviventes. Posteriormente, as plantas foram podadas para permitir a contagem do número de estipes e/ou apotécios formados sobre a superfície dos vasos.

O experimento constou de 5 repetições, contendo 3 plantas por vaso e 3 escleródios por planta. O delineamento experimental foi fatorial em blocos ao acaso.

### 3.22 - COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE ALFACE, *in vivo*.

O preparo do inóculo dos mutantes, do substrato, transplante e inoculação deu-se como no item 3.21, sem o patógeno. Após 45 dias, as plantas foram podadas e a avaliação deu-se pelo peso de matéria fresca.

Cada tratamento constou de 5 repetições contendo 3 plantas por vaso e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

### 3.23 - COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

DE ALFACE, EM PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRODIONE,  
*in vivo*.

O preparo do experimento deu-se como no ítem 3.21. Após 24 horas da inoculação, 40 ml das suspensões dos fungicidas foram usados para regar os vasos. O fungicida benomil e iprodione foram usados nas concentrações 1000 e 500ppm, respectivamente. Para os Experimento I e II, as plantas de alface foram podadas aos 45 e 30 dias, e a avaliação deu-se pelo peso de matéria fresca.

Cada tratamento constou de 5 repetições contendo 3 plantas por vaso e o experimento foi repetido duas vezes. O delineamento experimental foi o fatorial em blocos ao acaso.



## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5

A frequência de obtenção de mutantes e a apresentação dos mutantes auxotróficos e suas respectivas marcas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Como pode ser observado, os 28 mutantes morfológicos de *T. harzianum* TW5 foram obtidos pelo Método de Isolamento Total enquanto que os mutantes auxotróficos, pelo Método de Enriquecimento por Filtração. Pelo Método por Enriquecimento, foram isolados 19 mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5. Após a caracterização das marcas auxotróficas para aminoácidos ou vitaminas, efetuou-se o teste de reversão. Os mutantes que exibiram baixa ou nenhuma reversão.

Estes resultados divergiram de alguns dos relatos existentes na literatura, onde mutantes morfológicos e auxotróficos foram obtidos pelas duas técnicas utilizadas (BAGALHI, 1987; FUNGARO, 1984; SILVEIRA & AZEVEDO, 1984). Se, neste trabalho a amostragem usada tivesse sido maior, provavelmente a distribuição na obtenção dos mutantes morfológicos e auxotróficos entre os dois métodos empregados teria sido diferente. Os resultados deste trabalho também demonstram a estabilidade genética da maioria dos mutantes

obtidos.

Uma importante característica que deve ser observada em um fungo candidato à antagonista, é sua habilidade em crescer, colonizar e esporular em seu ambiente. Pelo fato de, neste trabalho, os organismos em questão serem mutantes, fez-se necessário observar se a habilidade para crescer e esporular sobre um substrato havia sido mantida ou tornado superior à linhagem selvagem. Através da análise de variância (Apêndice 1), foram detectadas diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) no comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 quanto ao crescimento radial das colônias para um mesmo meio ou entre os meios de cultura, assim como existiram diferenças entre os mutantes quanto ao crescimento radial para um mesmo tempo. Como pode ser observado na Tabela 3, os resultados para cada mutante em relação aos tempos e meios de cultura, TW5-600 e TW5-537 foram os únicos a exibirem diferenças estatísticas entre todos os tempos quanto ao crescimento radial, por apresentarem um crescimento mais lento. As demais variações detectadas com 24h e 48h desapareceram com 72h.

Após 15 dias, as placas usadas para a caracterização dos mutantes quanto ao crescimento radial, foram lavadas e os conídios recolhidos para contagem (Tabela 4). Através da análise de variância (Apêndice 2) foram detectadas diferenças significativas ( $p=0,01$ ) no comportamento de mutantes de *T.harzianum* TW5 quanto à esporulação para um mesmo mutante entre os dois meios de cultura, assim como existiram diferenças entre os mutantes para um mesmo meio analisado. Para o meio de BDA, TW5-600 exibiu a maior taxa de conídios produzidos, não diferindo estatisticamente do TW5-537 ou do TW5-533. TW5-574 apresentou a mais baixa taxa de conídios produzidos, não diferindo estatisticamente da linhagem selvagem TW5, TW5-609, TW5-410 e TW5-534. Para o meio de Aveia, TW5-600, TW5-537, TW5-533, TW5-555, TW5-612 e TW5-534 não diferiram entre si, do TW5-609 ou do TW5-560, e apresentaram as mais altas concentração de conídios. De forma geral, a esporulação no meio de Aveia foi

mais alta que no meio de BDA.

A variabilidade detectada entre mutantes obtidos através da irradiação ultra-violeta tem sido relatada. Observações feitas por SILVA (1991) foram discordantes deste trabalho. O autor observou que os mutantes resistentes ao benomil de *T. harzianum* TW5, TW5-2B4 e TW5-2B9, tanto exibiram as mais altas porcentagens de redução do crescimento micelial como as mais baixas taxas de produção de conídios em meio de Aveia. Estes mutantes também exibiram variações quanto à formação de anéis nas colônias; frequência de conídios uninucleados e/ou binucleados e tamanho dos conídios.

#### 4.2 - TESTE DE ANTIBIOSE DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS DE *T. harzianum* TW5 CONTRA *S. sclerotiorum* #1.

As espécies de *Trichoderma* produzem antibióticos de amplo espectro, voláteis e não-voláteis. Os experimentos de antibiose têm demonstrado que a produção de metabólitos tóxicos varia amplamente entre diferentes espécies ou dentro de cada espécie (DENNIS & WEBSTER, 1971a; DUTTA, 1981). As análises de variância (Apêndice 3) indicaram as diferenças significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre os mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 quanto à redução do crescimento micelial do patógeno, causada pela produção de metabólitos tóxicos. Como pode ser observado na Tabela 5, para o primeiro teste, TW5-523 e TW5-555 não diferiram entre si assim. Na repetição deste teste, apenas TW5-523 diferiu significativamente dos demais e manteve os resultados anteriores.

As reduções no crescimento micelial foram possivelmente causadas por metabólito(s) tóxico(s) liberado(s) ao meio e, as diferenças nas porcentagens de redução do crescimento micelial foram consideradas como variabilidade entre os mutantes.

Em seu trabalho SILVA (1991) também observou que isolados de *T. viride* e *T. harzianum*, incluindo o isolado *T. harzianum* TW5, inibiram em cerca de 100% o crescimento micelial de *S.*

*minor*. Posteriormente, testando os mutantes de *T. harzianum* TW5 resistentes ao benomil relatou que, com exceção dos TW5-2B6 e TW5-2B8, os demais mutantes e a linhagem selvagem TW5 apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial de *S. minor* e *S. sclerotiorum*. SILVA & MELO (1989) utilizando as linhagens *T. harzianum* TMA4 e TW5, obtiveram mutantes resistentes ao fungicida iprodione, os quais inibiram em até 100% o crescimento radial de *S. minor*.

Mutantes de *T. harzianum* resistentes à fungicidas têm mostrado alta produção de dois metabólitos não identificados (um termo-estável e o outro termo-instável), e exibido variabilidade quanto às porcentagens de redução do crescimento micelial de fitopatógenos (PAPAVIZAS *et al*, 1982).

Esta variabilidade também foi relatada entre os isolados de *Trichoderma* spp. Dois isolados *T. viride* e um *T. koningii* mostraram reduzir o crescimento micelial de *Fomes annosus* e *R. solani*, mas não dos outros patógenos testados. *T. viride* I6 foi efetivo contra *P. ultimum* mas não controlou *Pyronema domesticum*; *T. viride* não foi hábil em reduzir o crescimento micelial de *P. ultimum* porém controlou *P. domesticum*. Os autores observaram que a diversidade inter e intra-específica entre os isolados de *Trichoderma* spp. foi a responsável pelos resultados diferenciados sobre os fitopatógenos. Foi sugerido que esta variabilidade deveu-se tanto à produção de compostos químicos inteiramente diferentes quanto à produção de um mesmo composto mas em diferentes concentrações (DENNIS & WEBSTER, 1971a,b).

A competição intra e inter-específica entre organismos parece ser um fator importante e determinante na densidade populacional na natureza. A capacidade de produzir antibióticos tem mostrado elevar a atividade antagônica e melhorar a capacidade competitiva (DUTTA, 1981; ELAD *et al*, 1984; HADAR *et al*, 1979). Vários metabólitos tóxicos produzidos por *Trichoderma* spp. foram produzidos em frações da matéria orgânica do solo (Wright, 1965, citado por PAPAVIZAS, 1985),

porém não há evidências diretas que estes antibióticos sejam produzidos no solo em quantidade suficiente para induzir resultados efetivos de controle biológico de fitopatógenos (PAPAVIZAS, 1985). Os antibióticos produzidos no contato direto entre microrganismos, embora produzidos continuamente e em baixas concentrações, parecem menos sujeitos à decomposição biótica (BAKER, 1987b).

#### 4.3 - COMPORTAMENTO DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 À DIFERENTE FONTES DE CARBONO.

A habilidade de espécies de *Trichoderma* excretarem  $\beta$ -(1,3)-glucanase e quitinase em meio de cultura suplementado com laminarina, quitina ou parede celular de fitopatógenos como fonte de carbono, tem justificado a atividade lítica destes contra *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* e *S. sclerotiorum* (CHET & HENIS, 1969; CRUZ *et al*, 1993; ELAD *et al*, 1982a,b, 1983; HADAR *et al*, 1979; JONES *et al*, 1974; SIVAN & CHET, 1989; WU, 1977). A enzima semi-constitutiva  $\beta$ -(1,3)-glucanase pode ser induzida por substratos como: laminarina, amido de milho, xilose, manitol e glicerol. Entretanto, em presença de laminarina a produção da enzima é aumentada. Quitinase é uma enzima induzível e pode ser excretada pela maioria dos microrganismos em meios de cultivo contendo quitina (Bull & Chesters, 1966, Monreal & Reese, 1969, citados por SIVAN & CHET, 1989; ELAD *et al*, 1982; REESE & MANDELS, 1959).

Uma vez que estas enzimas líticas foram correlacionadas com a atividade micoparasítica do patógeno *Sclerotinia* spp. (DENNIS & WEBSTER, 1971a,b,c; ELAD *et al*, 1983a,b; SIVAN & CHET, 1989) justificaram-se, neste trabalho, as verificações do comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 quanto à capacidade em utilizar diferentes fontes de carbono.

A análise de variância (Apêndice 4) detectou diferenças

estatísticas significativas ( $p=0,05$ ) entre os mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. reesei* QM9414 quanto atividade celulolítica, pelo método semi-quantitativo, sobre de filtro básico. Como pode ser observado na Tabela 6, TW5-600 seguido pelo TW5-2B6, diferiram estatisticamente dos demais, apresentando alta atividade celulolítica. Posteriormente, apareceram TW5-2B2, TW5-2B1, TW5-560 e *T. reesei* QM9414. A seguir, linhagem selvagem TW5 e os demais nove mutantes que não diferiram estatisticamente entre si quanto aos mais baixos índices de atividade celulolítica.

Quanto à produção micelial em meio de cultura suplementado com laminarina, a análise de variância (Apêndice 7) detectou diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) quanto à produção micelial entre os meios de cultura suplementado ou não, assim como, entre os mutantes para um mesmo meio de cultura. Como pode ser observado na Tabela 5, todos os mutantes mostraram diferenças significativas quando foram comparados os pesos de matéria seca produzidos na ausência e presença da laminarina. Na presença de laminarina, TW5-2B2 e TW5-523 exibiram os maiores pesos de matéria seca, e não diferiram entre si assim como não diferiram do TW5-2B1, TW5-2B6, TW5-410 e T95. A linhagem selvagem TW5, que não diferiu de TW5-2B1, T95 e linhagem selvagem WT-T95, mostrou o menor peso de matéria seca produzido. O mutante T95 não diferiu da linhagem selvagem WT-T95.

Na verificação da produção micelial frente à fonte de carbono Quitina, a análise de variância (Apêndice 6) indicou diferenças significativas ( $p \leq 0.01$ ) quanto à produção micelial entre os meios de cultura suplementado ou não, assim como, entre os mutantes para um mesmo meio de cultura. Como pode ser observado na Tabela 7, todos os mutantes mostraram diferir significativamente quanto à maior produção micelial entre os meios de cultura suplementado ou não com quitina. Na presença de quitina, T95 e TW5-2B1 não diferiram da linhagem selvagem TW5, TW5-2B2, TW5-2B6 e TW5-523, e apresentaram as mais altas taxas de matéria seca produzidas. Por outro lado, TW5-410, TW5-

523 e linhagem selvagem WT-T95 não diferiram entre si e exibiram a mais baixa produção micelial. O mutante T95 produziu cerca de 9 vezes mais matéria seca quando comparado com a linhagem selvagem WT-T95.

Estes resultados podem ser usados para explicar o desempenho dos mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, no controle do crescimento micelial do fitopatógeno no teste de Cultura Pararela; do tamanho das lesões formadas sobre pedaços de aipo pelos isolados *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor*; da redução do número de escleródios formados nos testes de cultura pareada, pelos isolados *S. sclerotiorum* #1 e 2, *in vitro*, assim como número de estipes e/ou apotécios formados. Entretanto, mesmo tendo mostrado habilidades hiperparasíticas ou a capacidade para usar quitina ou laminarina como única fonte de carbono, estes mutantes e linhagens selvagens não produziram e/ou excretaram as enzimas  $\beta$ -(1,3)-glucanase e quitinase em quantidade suficiente para permitir um eficiente hiperparasitismo de escleródios se comparado aos observados na literatura.

As diferenças nos níveis enzimáticos detectadas entre os isolados de *Trichoderma* spp., têm justificado a variabilidade na atividade antagônica, e deveria ser mais usado como um método de seleção para novos isolados (Elad *et al*, 1981b, citados por ELAD *et al*, 1982). Na literatura são encontrado exemplos de isolados ou mutantes portadores de uma eficiente produção de celulase ou outras enzimas. Diferente de muitas bactérias, os fungos não colonizam o rizoplano ou os espaços imediatamente adjacente à raiz em crescimento quando aplicados às sementes. A carência desta habilidade, chamada incompetência em rizosfera, é uma característica desvantajosa para os fungos antagonistas. *T. harzianum* tem mostrado ser um eficiente agente de biocontrole, porém existem relatos de sua incompetência em rizosfera (CHAO *et al*, 1986; PAPAIVIZAS, 1981). HARMAN & HADAR (1983) correlacionaram a incompetência de rizosfera de *T. harzianum* com a falta de controle do tombamento de plantas

causado por *Pythium* sp.

A mucilagem recobrando a superfície da raiz na região de alongamento e contendo restos de paredes primárias das células epidérmicas da raiz, é constituída principalmente por carboidratos, uma mistura de glucana (na forma de microfibras de celulose) e polissacarídeos (FOSTER *et al*, 1983; OADES, 1978).

Enzimas celulolíticas têm sido tradicionalmente divididas em endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase e  $\beta$ -(1,3)-glucosidase (KNOWLES *et al*, 1987). Para uma hidrólise completa da celulose é necessário que as enzimas atuem em sinergismo. A endoglucanase hidrolisa as regiões amorfas das cadeias de glucana na superfície das fibras de celulose. Esta ação de clivagem é seguida pela celobiohidrolase, a qual retira as unidades de celobiose que ficaram expostas nas extremidades das cadeias. A celobiohidrolase não atacará as novas cadeias de glucanas expostas, e a endoglucanase novamente faz-se necessária. Assim, estas enzimas agem sinergicamente criando sítios de ação uma para a outra.  $\beta$ -(1,3)-glucosidase é a terceira importante enzima. Uma vez que a celobiose é o produto final inibidor da celobiohidrolase, a  $\beta$ -(1,3)-glucosidase age removendo este substrato, hidrolisando-o. O sinergismo entre a celobiohidrolase e  $\beta$ -(1,3)-glucosidase mostrou ser elevado em substratos altamente ordenados, baixo em substratos amorfos e ausente em substratos solúveis (ENARI, 1983).

Os resultados obtidos neste trabalho, através do peso de matéria seca, mostraram um melhor desempenho por parte dos mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 frente às fontes de carbono utilizadas. Quanto à verificação da produção micelial frente às seguidas fontes de carbono fibras de algodão, celulose microcristalina, carboximetil celulose e glucose, a análise de variância (Apêndice 8) detectou diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre os mutantes para uma mesma fonte de carbono assim como para um mesmo mutante entre as diferentes fontes de carbono. Como pode ser observado na Tabela 8, quando



fibras de algodão moídas foram empregadas, a linhagem selvagem TW5 exibiu os mais baixos pesos de matéria seca e diferiu de todos os mutantes da linhagem selvagem WT-T95, enquanto T95 apresentou os mais altos pesos de matéria seca e não diferiu de TW5-2B1, TW5-2B6, TW5-410 e TW5-523. Frente à fonte de carbono celulose microcristalina, TW5-2B2 e a linhagem selvagem WT-T95 apresentaram os mais baixos pesos de matéria seca, e diferiram dos demais mutantes e linhagens selvagens TW5 e WT-T95. T95 e TW5-2B6 não diferiram entre si e mostraram os melhores resultados. A linhagem selvagem TW5, TW5-2B1, TW5-2B6, TW5-410 e TW5-523 não diferiram entre si. Quando em presença das fontes de carbono carboximetil celulose e glucose, a linhagem selvagem TW5 apresentou os mais baixos pesos de matéria seca, e diferiu dos mutantes e da linhagem selvagem WT-T95. Frente à fonte de carbono Celobiose, a análise de variância (Apêndice 8) detectou diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) quanto à produção micelial entre os meios de cultura suplementado ou não, assim como entre os mutantes para um mesmo tratamento. Como pode ser observado na Tabela 7, em presença de celobiose, a linhagem selvagem TW5 e T95 exibiram, em média, a menor e a maior taxa de matéria seca, respectivamente, e diferiram dos demais mutantes e linhagem selvagem WT-T95.

Assim, neste trabalho, pode-se observar aumentos na produção micelial pelos mutantes de *T. harzianum* TW5 quando comparados com as respectivas linhagens selvagens, em presença de fibras de algodão, celobiose, carboximetil celulose e glucose; e pelo mutante T95, com relação à *T. harzianum* WT-T9, em presença de fibras de carbono e celulose microcristalina. Os mutantes de *T. harzianum* TW5 e o mutante T95 não diferiram entre si quanto à produção micelial frente às fontes de carbono fibras de algodão, carboximetil celulose e glucose. Desta forma, a atividade celulolítica, através da atividade sinérgica entre celobiohidrolase e endoglucanase pôde ser indiretamente observada comparando os resultados obtidos em presença de fibras de algodão e carboximetil celulose e, a

atividade sinérgica entre celobiohidrolase e  $\beta$ -(1,3)-glucosidase, através dos resultados em presença de fibras de algodão e celobiose. No entanto, a atividade sinérgica não foi observada em presença de celulose microcristalina. Variações nas respostas frente às fontes de carbono também foram observadas por Wood & McCrae, 1979, citados por ENARI (1983), os quais trabalhando com celobiohidrolase purificada, relataram diferenças significantes em extensão na qual os purificados puderam degradar substratos celulolíticos altamente ordenados. O mutante T95 exibiu os melhores resultados, e diferiu de seu parental, quando frente às fontes de carbono fibras de algodão e celulose microcristalina, porém as diferenças não foram detectadas frente às fontes de carbono celobiose e carboximetil celulose. Resultados semelhantes foram observados por AHMAD & BAKER (1987a; 1988b), os quais relataram que o T95, comparado com a linhagem selvagem WT-T95, exibiu um elevado peso de matéria seca em presença dos substratos fibras de algodão, celobiose e carboximetil celulose. O mutante *T. harzianum* T12B, por sua vez, mostrou um aumento na biomassa em presença de fibras de algodão e carboximetil celulose, porém não diferiu da linhagem selvagem T12 frente à celobiose. Entretanto, os resultados obtidos através dos índices enzimáticos mostraram que os mutantes T95 e T12B diferiram significativamente de seus parentais, e apresentaram os melhores resultados. Continuando, os autores correlacionaram a competência em rizosfera do T95 (superior ao T12B) e a carência desta atividade pelas linhagens selvagem WT-T95 e T12 tanto com a alta produção de celulase como com os altos índices da habilidade saprofítica competitiva (CSA) (AHMAD & BAKER, 1987c; 1988a). SULTAN (1994) usando mucilagem purificada adicionada ao meio de cultura, mostrou que T95 produz mais biomassa que os T12B e seus parentais, confirmando que T95 é competente em rizosfera por utilizar mucigel de forma mais eficiente que os demais.

A mucilagem pode representar uma importante fonte de energia às populações microbianas de rizosfera e rizoplano.

Estas populações têm exibido certa proteção às raízes contra os ataques dos fitopatógenos, resultante de uma ativa competição entre os fitopatógenos de crescimento lento e os microrganismos saprofíticos que rapidamente colonizam a mucilagem (OADES, 1978; Rougier & Chabourd, 1985, citados por SUTAN, 1994).

#### 4.4 - SENSIBILIDADE DE MUTANTE DE *T. harzianum* TW5 E WT-T95 A FUNGICIDAS BENOMIL E IPRADIONE, *in vitro*.

Estudos têm enfocados a necessidade de linhagens geneticamente modificadas com o objetivo de produzir mutantes superiores e melhor adaptados ao meio ambiente. Por outro lado, para os organismos serem usado em associação com produtos químicos, torna-se importante a indução de mutações para resistência à estes compostos. Em todos os casos, faz-se necessário verificar se as mutações induzidas não interferirão em outras características importantes, como crescimento, esporulação, produção de metabólitos tóxicos, atividade hiperparasítica, habilidade para sobreviverem no solo, etc. (AZEVEDO, 1991; PAPAVIDAS *et al*, 1982).

*Trichoderma* spp. têm um comportamento variável em relação à fungicidas, e poucos estudos têm sido realizados à propósito do uso destes agentes de biocontrole no controle integrado de doenças (ABD-EL MOITY, 1982). Uma grande vantagem da utilização deste antagonista está no fato de seus efeitos serem mais duradouro no ambiente, quando comparados com o efeito efêmero de um fungicida (MELO, 1991). A indução de resistência à fungicidas favorecerá a utilização destes agentes no controle efetivo de um ou mais fitopatógenos, em combinação com fungicidas.

Resultados obtidos neste trabalho mostraram que os dois mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 também possuíam alta resistência ao fungicida benomil e iprodione, e mantiveram características desejáveis à atividade antagônica, tais como, crescimento e esporulação, produção de substâncias tóxicas e

atividade hiperparasítica de micélio contra os isolados *S. sclerotiorum* #1 e 2 e *S. minor*. Estas características também foram observadas nos demais mutantes resistentes ao fungicida benomil de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95.

Pela análise da variância (Apêndice 9) e pelo teste de Tukey foram detectadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) quanto ao crescimento micelial entre os mutantes para uma mesma concentração, assim como para um mesmo mutante entre as concentrações do fungicida benomil acrescentado ao meio de BDA. Como pode ser observado na Tabela 9, a partir da concentração 5ppm, todos os mutantes e linhagem selvagem apresentaram 64,07% ou mais da redução do crescimento micelial, com exceções para os mutantes auxotróficos TW5-523 e TW5-410 e os mutantes resistentes ao fungicida benomil, TW5-2B1, TW5-2B2 e TW5-2B6, os quais foram resistentes à 1000ppm do fungicida. Os mutantes de *T. harzianum* TW5, que mostraram resistência ao fungicida benomil, foram verificados quanto a esporulação em meio de cultura BDA suplementado com 1000ppm do fungicida. A análise de variância (Apêndice 10) detectou diferenças significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre os mutantes para uma mesma concentração, assim como para um mesmo mutante entre os meios de cultura. Como pode ser observado na Tabela 10, para o meio de cultura suplementado com 1000ppm do fungicida, TW5-2B2 exibiu a mais alta esporulação, diferindo estatisticamente dos demais mutantes, os quais não diferiram entre si.

Quanto ao comportamento dos mutantes em meio de cultura BDA suplementado com o fungicida iprodione, a análise de variância (Apêndice 11) detectou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) para crescimento micelial dos mutantes em meio suplementado. Como pode ser visto na Tabela 11, todos os mutantes cresceram frente à concentração 500ppm, porém TW5-2B1 e TW5-2B6 apresentaram 0.00% na porcentagem de redução do crescimento. Os mutante de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 foram retestados quanto à sensibilidade ao fungicida benomil empregando o meio de cultura líquido Czapeck-Dox

suplementado com diferentes concentrações do fungicida benomil. Através das análises de variância (Apêndices 12 e 13) foram detectadas diferenças significativas ( $p \leq 0.01$ ) quanto à sensibilidade de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 para a mesma concentração do fungicida, ou para um mesmo mutante entre as diferentes concentrações empregadas (Tabelas 12 e 13). Os mutantes de *T. harzianum* TW5 não exibiram diferenças estatísticas quanto à sensibilidade ao fungicida entre as doses empregadas. Entretanto, o mutante T95, de *T. harzianum* WT-T95, mostrou diferenças significantes entre 0ppm e as demais concentrações. O teste de sensibilidade das linhagens selvagens *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 quanto à sensibilidade ao fungicida benomil mostrou que a *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 exibiram as menores produções miceliais à partir da concentração 1.0ppm.

Alguns trabalhos têm relatado sucessos na obtenção de mutantes através da luz ultra-violeta. O desenvolvimento de mutantes resistente para o biocontrole de fitopatógenos tem sido obtido de isolados como *T. harzianum* e *T. viride*. Alguns destes mutantes mostraram resistir à concentrações de 50-500ppm do fungicida benomil, *in vitro* (PAPAVIZAS, 1985). Os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos fungicidas são: a modificação no sítio de ação, resultando em menor afinidade com o fungicida; desvio do sítio bloqueado por operação alternativa; redução da absorção ou acúmulo do fungicida; processos de destoxificação, etc. (DEKKER & GEORGOPOULOS, 1982; GHINI, 1989). Uma das principais formas de ação dos fungicidas do grupo dos benzimidazóis é a instabilidade mitótica à níveis baixos destes fungicidas, ou da inibição à níveis mais altos. Os fungos filamentosos podem adquirir resistência à estes fungicidas por alterações da  $\beta$ -tubulina, componente dos microtúbulos (DAVIDSE & FLACH, 1977), e este também foi o mecanismo proposto por PETERBAUER *et al* (1992) para explicar a resistência ao fungicida benomil e competência em rizosfera do mutante *T. harzianum* T95.

Mutantes de *T. reesei* e *T. viride*, resistente aos fungicidas benomil, iprodione e Maneb, mantiveram a característica de inibirem os fitopatógenos *Venturia inaequalis*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea* (BENSACI & NEUMANN, 1989). GULLINO & GARIBALDI (1988) obtiveram mutantes resistentes a diversos fungicidas e ativos contra míldio mas que, quando aplicados sem fungicidas, controlavam parcialmente o mofo-cinzento causado por *B. cinerea*.

PAPAVIZAS & LEWIS (1983) obtiveram mutantes de *T. viride* T1, os quais mostraram resistência aos fungicidas benomil, tiabendazole e tiofanato metílico, além da habilidade em suprimir *P. ultimum* em ervilha e *S. rolfsii* em feijão. LOCKE *et al* (1985) testaram os 6 mutantes de *T. viride* T-1 acima citados e 22 novos isolados de *Trichoderma* spp, no controle de *F. oxysporum* f.sp. *chrysanthemi*. Apenas a linhagem selvagem *T. viride* T-1 e os mutantes T1-R4 e T-1-R9 mostraram reduzir as porcentagens de plantas mortas e aumentaram o número de podas. Posteriormente, em experimento de controle integrado empregando o mutante T-1-R9 e o fungicida benomil aplicado ao solo em intervalos de 14, 28 ou 42 dias, a presença do mutante T-1-R9 foi suficiente para reduzir a porcentagem de plantas mortas. No entanto, o controle químico e o controle integrado não diferiram entre si e mostraram-se superiores ao controle biológico.

Segundo ABD-EL MOITY (1982), a combinação do fungicida iprodione e de mutante *T. harzianum* resistente ao iprodione, ofereceu um alto índice de controle de *S. cepivorum* em cebola, quando comparado somente ao emprego do fungicida. PAPAVIZAS *et al* (1982) obtiveram mutantes de *T. harzianum* WT6 que, além de serem resistentes ao fungicida benomil, apresentaram alta produção de metabólitos tóxicos, melhorando o desempenho antagônico na supressão de *R. solani* em algodão e rabanete, *S. rolfsii* em cebola e *Pythium* sp em ervilha.

O mutante *T. viride* T2b, obtido por MELO (1989), mostrou ser produtor de metabólitos tóxicos contra *S. minor*, enquanto

que o mutante *T. viride* M6 protegeu plantas de alface da doença em aproximadamente 80% quando comparado com a testemunha não inoculada com o mutante, e em 50% quando comparado com a linhagem selvagem. SILVA(1991) conseguiu 10 mutantes de *T. harzianum* resistentes a altas concentrações de benomil e com capacidade de inibir o crescimento micelial e germinação de escleródios de *S. minor*, *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*.

Irradiação ultravioleta seguida de mutagênico químico dietil sulfonato permitiu a LIU (1988) obter um mutante de *T. harzianum* resistente ao benomil, o qual manteve a atividade hiperparasítica e antibiose contra *R. solani* e *S. rolfsii*. Em ensaios de campo, a severidade da doença de crisântemo e feijão causada por *R. solani* foi significativamente mais baixa, com a aplicação do mutante ao solo.

KRAFT & PAPAVIDAS (1983) obtiveram mutantes de *T. harzianum* WT6 resistente à metalaxyl. Quando aplicados em tratamento integrado de sementes à serem usadas em campo infestado com *P. ultimum*, resultou em plantas mais saudas e de alta produção. O tratamento combinado não foi melhor que cada um separadamente, entretanto, observou-se que a população de *T. harzianum* aumentou ligeiramente na presença do fungicida.

*Trichoderma* spp., resistentes ao fungicida benomil, têm mostrado reação cruzada com outros fungicidas do grupo dos benzimidazoles. A resistência cruzada é assumida com a evidência de que a sensibilidade a ambos os produtos fungicidas seja controlada pelos mesmos genes (PICININI, 1994). SILVA (1991) obteve mutantes de *T. harzianum* TW5, resistentes à 2.000ppm do fungicida benomil, que também foram resistentes aos fungicidas thiabendazole, thiofanato metílico e iprodione. Da mesma forma, os mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 que mostraram resistência ao fungicida benomil, apresentam certa redução no crescimento micelial quando em meio de BDA suplementado com o fungicida iprodione.

O interesse em estudar a resistência à fungicidas por mutantes de *Trichoderma* sp. está na utilização deste

antagonista no controle integrado de fitopatógenos. Conídios e/ou micélios de isolados resistentes poderão ser usados em conjunto com o controle químico em tratamentos de sementes, pulverizações foliares, substratos usados em casas-de-vegetação ou aplicações ao solo (PAPAVIZAS *et al*, 1982).

#### 4.5 - AVALIAÇÕES DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 CONTRA *S. sclerotiorum* #1 E 2 E *S. minor*.

As cultivares de alface são suscetíveis tanto a *S. sclerotiorum* quanto a *S. minor*. Estes fitopatógenos produzem escleródios que podem sobreviver no solo por três à oito anos, dificultando as medidas de controle. Ambos podem infectar as raízes, caules e partes senescentes das plantas de alface. Um único escleródio, através da germinação miceliogênica, pode ser suficiente para infectar e matar uma planta, ou, através da germinação carpogênica, começar uma epidemia (ADAMS & AYERS, 1979; COOK *et al*, 1975; SCHWARTZ & STEADMAN, 1978; STEADMAN, 1983).

*Trichoderma* spp. têm demonstrado controlar estes fitopatógenos através da produção de antibióticos, competição e atividade hiperparasítica, acarretando em reduções das taxas de crescimento micelial, número de escleródios e apotécios formados e reduzir a viabilidade de escleródios.

Neste trabalho procurou-se observar o comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 nas diferentes fases do ciclo vital de *S. sclerotiorum* e contra *S. minor*. Durante as avaliações pelo teste de antibiose, observou-se que o mutante auxotrófico TW5-523 diferiu da linhagem selvagem TW5 ao causar 100% de redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* #1.

Pelas análises de variância (Apêndice 14, 15 e 16) foram observados o comportamento dos mutantes quanto à porcentagem de redução do crescimento micelial das colônias e/ou formação de escleródios de *S. sclerotiorum* da escala de notas, pelo teste



de Antagonismo em Confrontação Direta. Como pode ser observado nas Tabelas 14 e 15, as linhagens selvagens TW5 e WT-T95 e mutantes reduziram o crescimento das colônias e diferiram do controle *S. sclerotiorum* #1 e/ou #2. Com relação ao número de escleródios formados os mutantes mostraram-se eficientes em reduzir o número de escleródios quando comparados com controle. Segundo os critérios de BELL *et al* (1982), os mutantes TW5-535, TW5-555, TW5-534 e TW5-523 receberam as melhores notas por invadirem completamente as colônias do patógeno e colonizarem o substrato (nota 1) e foram comparados à linhagem selvagem *T. harzianum* TW5.

Variabilidade como esta, entre isolados ou mutantes, ou destes frente à diferentes fitopatógenos, tem sido observada por alguns autores. SILVA (1991) relatou que os mutantes TW5-2B1 e TW5-2B2 receberam nota 1, não diferindo de *T. harzianum* TW5, e cresceram sobre as colônias de *S. minor* colonizando completamente o substrato, enquanto TW5-2B6 recebeu nota 2, mostrando um desempenho inferior. Frente ao *S. sclerotiorum*, a linhagem selvagem TW5 e o TW5-2B2 receberam nota 1, diferindo dos outros mutantes, os quais receberam notas 2.

*Trichoderma* spp. têm apresentado evidências tanto da produção de antibióticos difusíveis como da degradação enzimática das hifas de fitopatógenos. A atividade lítica de fungos (assim como das bactérias) é devido principalmente às enzimas líticas  $\beta$ -(1,3)-glucanase e quitinase. A atividade direta do micoparasitismo de *Trichoderma* spp. é um dos maiores mecanismos propostos para explicar a atividade deste antagonista contra fitopatógenos do solo (SIVAN & CHET, 1989; DENNIS & WEBSTER, 1971a). Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante o processo de vida do antagonista. Por exemplo, o antagonista pode causar a morte e degradação das hifas hospedeiras pela secreção de antibióticos, e/ou poder enrolar-se ao redor da hifa hospedeira e crescer usando o conteúdo das células mortas. No contato entre os dois fungos, o antagonista produz estruturas semelhantes à

apressórios que usam para aderirem à parede do hospedeiro. Após a digestão, invadem e crescem dentro de suas hifas. Não só o micélio, mas também outras estruturas de resistência do hospedeiro podem ser atacadas, tais como cistos, microescleródios, oosporos, escleródios e esporos. Desta forma, os mecanismos se sobrepõem, oferecendo aos antagonistas nutrientes necessários ao seu crescimento (CHET & ELAD, 1983; COOK & BAKER, 1983; ELAD *et al*, 1987; MELO, 1991).

Esta habilidade em reduzir o crescimento micelial e/ou a produção de escleródios tem sido relatada. LYNCH (1987) observou que isolados de *T. harzianum* cresceram sobre colônias de *S. sclerotiorum* e inibiram completamente a produção de escleródios. SILVA & MELO (1989) obtiveram mutantes de *T. harzianum* TMA4 e TW5 resistentes ao fungicida iprodione que inibiram em até 100% o crescimento radial de *S. minor*, em teste de Confrontação Direta.

LEE & WU (1984) testaram isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado de *G. virens* contra *S. sclerotiorum*, e constataram que, apesar de todos terem sido capazes de crescer sobre as colônias do patógeno, os isolados apresentaram diferenças no comportamento usadas para diferenciá-los em três grupos. Os isolados do primeiro grupo apresentaram crescimento lento e não foram capazes de inibir a formação de escleródios. O segundo grupo foi formado por isolados de crescimento rápido que não influenciaram na redução de escleródios formados, e no terceiro grupo os isolados mostraram crescer rapidamente inibindo a formação de escleródios

Um agente ideal de biocontrole, segundo WHIPPS (1987), seria aquele com habilidade para competir e controlar os patógenos por crescer e ocupar os resíduos como fonte de alimento. Assim, realizou-se neste trabalho um teste de Confrontação direta contra *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor* sobre segmentos de aipo. As análises de variância (Apêndices 17 e 18) detectaram diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0.01$ ) quanto ao comportamento antagônico de mutantes sobre *S.*

*sclerotiorum* #1 e *S. minor*. Como pode ser observado nas Tabelas 16 e 17, a influência dos mutantes sobre o crescimento micelial dos patógenos resultou em lesões menores assim como na redução do número de escleródios formados sobre os segmentos de aipo. Um segundo experimento foi realizado com o objetivo de observar se o tempo de inoculação do patógeno influenciaria o comportamento antagônico dos mutantes. As análises de variância (Apêndice 19 e 20) detectaram diferenças significativas ( $p \leq 0.01$ ) tanto para cada mutante entre os diferentes tempos, como entre os mutantes para cada tempo. Como pode ser observado na Tabela 18 e 19, os tempos de inoculação de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor* pouco influenciaram no comportamento antagônico do mutantes, repetindo os resultados acima obtidos tanto para o tamanho das lesões como para o número de escleródios formados sobre segmentos de aipo.

Estes resultados apresentaram-se parcialmente concordantes com aos obtidos por WHIPPS (1987). O autor observou que os isolados de *T. harzianum* IMI298374, IMI275950 e WT6 exibiram habilidade para crescer sobre a superfície de segmentos de alface, aipo e tomate, inibindo a formação de lesões e de escleródios, *in vitro*. E, que os candidatos à antagonistas, quando transferidos para os tecidos das plantas 24h antes ou ao mesmo tempo que *S. sclerotiorum*, mostraram melhores resultados na inibição na formação de escleródios, ao serem tranferidos 24h após a aplicação do patógeno.

Os escleródios de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor* foram transferidos para vasos contendo solo natural, junto às plantas de alface, em condições de casa-de-vegetação. As análises de variância (Apêndices 21 e 22) detectaram diferenças significativas ( $p = 0.05$ ) quanto ao comportamento de mutantes sobre escleródios e a sobrevivência de plantas de alface. Como pode ser observado na Tabela 20, o controle não inoculado, TW5-2B6 e T95 não diferiram entre si ou dos mutantes, porém diferiram do controle inoculado *S. sclerotiorum* e do TW5-523, e apresentarem 100% de plantas sobreviventes. Quando o patógeno

empregado foi o isolado *S. minor*, os resultados não diferiram muito. A linhagem selvagem TW5, TW5-2B6 e o controle não-inoculado não diferiram entre si ou dos demais, porém, diferiram do controle inoculado *S. minor* e TW5-523, os quais não diferiram entre si e apresentaram cerca de 100% de plantas sobreviventes.

Procurando observar a atividade hiperparasítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre os escleródios dos isolados *S. sclerotiorum* #1 e 2, foram empregados os escleródios formados na presença (ítems 3.10 e 3.15) ou na ausência dos mutante mas posteriormente tratados com estes. As análises de variância (Apêndices 23, 24 e 25) detectaram diferenças significativas da atividade hiperparasítica de mutantes e das linhagens selvagens TW5 e WT-T95, visualizada através da porcentagem de recuperação (crescimento micelial) do patógeno quando os escleródios foram depositados no meio de BDA, sobre papel de filtro ou fatias de cenouras. Como podem ser observados nas Tabelas 21, 22 e 23, os resultados obtidos entre os três métodos mostraram-se bastante variáveis. No entanto, independente da origem dos escleródios ou do método empregado para a desinfecção de superfície, foi constatada a viabilidade de 100% dos escleródios depositados sobre fatias de cenoura. Estes dados reportam a baixa atividade hiperparasítica dos mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródio dos isolados *S. sclerotiorum* #1 e 2, nas condições experimentadas.

Têm sido observadas respostas como estas entre os isolados de *Trichoderma* sp. DAVET (1986) observou que 22 isolados de *Trichoderma* sp. mostraram um comportamento semelhante quanto à atividade hiperparasítica, em solo esterilizado. No entanto, em solo natural, o comportamento foi muito diferente, mostrando a diversidade existente entre os isolado, assim como da influência da microflora no potencial antagonista destes isolados. No entanto, a combinação de isolados antagonista no solo pode levar à resultados positivos. HUANG (1980) e HUANG &

HOES (1976) observaram que a combinação dos isolados *T. viride* e *Gliocladium catenulatum* reduziu a viabilidade dos escleródios de 10 vezes mais cada isolados empregado separadamente.

IMOLEHIN & GROGAN (1980) estudando solos de diferentes regiões de Salinas, California, conhecidas pela intensiva produção de alface e por possuírem um natural e relativamente eficiente controle biológico da podridão de esclerotínia, observaram que *Trichoderma* spp. foi o mais comum e efetivo micoparasita de escleródios de *S. minor*. O antagonista foi encontrado colonizando tanto os escleródios encontrados no solo como nos formados em tecidos de plantas infectadas. Entretanto, ADAMS (1989) observou que um dos isolados de *Trichoderma* spp. foi inefetivo em reduzir o número de escleródios formados por *S. minor*. Entretanto, NIPOTI *et al* (1983) testando três isolados de *Trichoderma* sp. contra *S. minor*, inoculados 24 horas antes do transplante das plantas de alface, observaram diferenças no comportamento dos candidatos à antagonista. Os isolados *T. harzianum* e *Trichoderma* sp. reduziram o número de plantas mortas e aumentaram o peso de matéria seca, enquanto o isolado *T. viride* não mostrou resultados positivos.

SANTOS & DHINGRA (1982) observaram que, dos vários isolados de *Trichoderma* spp. testados quanto ao hiperparasitismo de escleródios, apenas cinco isolados de *T. koningii*, dois isolados de *T. pseudokoningii* e um *Trichoderma* sp. inviabilizaram de 62-100% dos escleródios. Apenas um isolado de *T. koningii* mostrou ser capaz de inviabilizar 100% dos escleródios em condições de campo. O declínio dos escleródios foi maior quanto mais altas as concentrações dos inóculos de *Trichoderma* sp. LEE & WU (1984) observaram que, dentre 37 isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado de *G. virens*, apenas os isolados *T. virens*-8I e o *G. virens* mostraram habilidade para penetrar e multiplicar-se dentro dos escleródios, inviabilizando-o. TRUTMANN & KEANE (1990) observaram que *T. koningii* pode parasitar escleródios de *S. sclerotiorum*, *in vitro* e *in vivo*. Quando aplicados em

condições de campo, em tratamento de pré-plantio, reduziram significativamente a viabilidade dos escleródios e aumentaram o número de escleródios infectados como o antagonista. Estes resultados mostrando a diversidade existentes entre os isolados de *Trichoderma* spp. quanto à atividade hiperparasítica de escleródios, têm sido obtidos tanto de experimentos onde os escleródios foram pré-tratados com suspensões de conídios dos antagonistas (ADAMS, 1989; ARTIGUES & DAVET, 1984; SANTOS & DHINGRA, 1982; ZAZZARINI & TOSI, 1985), quanto de experimentos onde os escleródios foram incubados em/ou obtidos de solos naturais (DAVET, 1986; KNUDSEN *et al*, 1991; PHILLIPS, 1989; SANTOS & DHINGRA 1982; WHIPPS, 1987). As diferenças nas respostas podem tanto ser devido à diversidade existente entre espécies ou dentro de uma mesma espécie, como quanto aos métodos empregados para avaliar a atividade hiperparasítica de escleródios, pelos antagonistas.

A maioria dos trabalhos para avaliar a atividade hiperparasítica, observam as colônias dos candidatos à antagonistas crescendo ao redor dos escleródios, sobre meio de BDA (ARTIGUES & DAVET, 1984; BUDGE & WHIPPS, 1991; DAVET, 1986; KNUDSEN & ESCHEN 1991; SINGH, 1991) ou Meio Ágar-Água (SANTOS & DHINGRA, 1982; TRUTMANN & KEANE, 1990). No entanto, MUELLER *et al* (1985) observaram que os candidatos à antagonista exibiram atividade hiperparasítica e reduziram a porcentagem de recuperação do patógeno, tanto dos escleródios como dos apotécios, *in vitro*. O interessante neste estudo foi constatar que a atividade hiperparasítica, medida pela taxa de recuperação dos antagonistas em meio de cultivo BDA à partir de escleródios colonizados, não foi equivalente quanto à redução da produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum*, obtidos sobre vermiculita. Os autores sugeriram que o hiperparasitismo de escleródios não deveria ser medido pela porcentagem de recuperação dos agentes de biocontrole dos escleródios, mas sim pela incapacidade dos escleródios germinarem tanto miceliogênica como carpogenicamente.

Este tipo de cuidado tem sido observado em poucos trabalhos. MCCREDIE & SIVASITHAMPARAM (1985), procurando um eficiente isolado de fungo capaz de infectar escleródios de *S. sclerotiorum*, escolheu como critério de seleção, observar a integridade da medula dos escleródios tratados. Os tratamentos com os dois isolados de *T. hamatum* e os três isolados de *T. harzianum* mostraram não causar alterações na integridade da medula ou inviabilizar os escleródios analisados. ZAZZERINI & TOSI (1985), em conduta semelhante, depositaram os escleródios pré-tratados e lavados sobre fatias de cenoura mantidas em placas de Petri. Os tratamentos com *T. viride* e os isolados *T. harzianum* 31 e 30 exibiram resultados excelentes, mostrando 100, 100 e 96% de escleródios inviáveis, respectivamente.

Estes relatos são plenamente concordante com os dados obtidos neste trabalho, uma vez que independente da forma como os escleródios foram obtidos ou tratados, foram altas as porcentagens de recuperação dos antagonistas em meio de BDA ou sobre papel de filtro. O rápido crescimento micelial dos candidatos à antagonista sobrepôs o crescimento micelial do patógeno, oferecendo a falsa idéia de hiperparasitismo sobre escleródios tratados. No entanto, quando os escleródios foram partidos ao meio, exibiram medula sadias. Estas metades, ao serem transferidas para pedaços de tecido vegetal fresco (no caso, fatias de cenoura) para favorecer o crescimento do patógeno, permitiram constatar a viabilidade de 100% destes escleródios.

Posteriormente, procurou-se observar as interações entre os mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 contra o isolado de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor*, e a sobrevivência de plantas de alface em solo natural. Os escleródios dos patógenos foram transferidos para os vasos ao lados de plantas de alface. Em presença de *S. sclerotiorum*, os mutantes TW5-2B6 e T95 diferiram do controle e mostraram 100% de plantas sobreviventes, enquanto que, frente à *S. minor*, a linhagem selvagem TW5 e o mutantes TW5-2B6 foram os que diferiram do

controle e exibiram os melhores resultados.

LYNCH (1987) observou que, em condições de campo, o isolado *T. harzianum* IMI275950 mostrou-se mais efetivo que *T. harzianum* IMI284726, ao prevenir a morte de plântulas de alface causada por *S. sclerotiorum*, embora tenha mostrado um efeito inibidor ao crescimento das raízes. Posteriormente, LYNCH *et al* (1991) obtiveram resultados positivos, destes isolados, como promotores de crescimento de plantas de alface. BUDGE & WHIPPS (1991) testando os isolados *T. harzianum* (HH3), *Trichoderma* sp. e *C. minitans*, quanto à habilidade em controlar *S. sclerotiorum* durante um cultivo de aipo e dois cultivos subsequentes de alface, observaram que os isolados de *Trichoderma* sp. não foram efetivos no controle da doença e pouco influenciaram na sobrevivência de escleródios, mesmo tendo sido recuperados do solo ao longo dos experimentos.

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* tem por característica a alta frequência da germinação carpogênica por seus escleródios. Os apotécios produzidos dispersam violentamente os esporos sexuais. Os ascosporos, tanto provenientes de apotécios do próprio campo como por dispersão, são os maiores causadores deste tipo de podridão (BEN-YEPHET *et al*, 1986; PATTERSON & GROGAN, 1985). Explicações sobre os processos naturais que levam à um possível declínio da podridão branca causada por *S. sclerotiorum*, estão as possíveis reduções na sobrevivência de escleródios, justificadas pela diminuição de reservas causada por formações sucessivas de apotécios, ou, porque durante a formação de apotécios ocorrem aberturas naturais das camadas externas do escleródios, as quais facilitam a entrada de microrganismos (MERRIMAN, 1976).

As análises de variância (Apêndice 26, 27, 28, 30, 31 e 32) seguidas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ,  $p = 0.05$ ,  $p = 0.05$  e  $p \leq 0.05$ , respectivamente) detectaram diferenças significativas da influência de mutantes na produção de estipes e/ou apotécios produzidos pelos isolados *S. sclerotiorum* #1 e 2, na ausência ou presença dos fungicidas benomil e iprodione, *in vitro* ou *in*



vivo. Como pode ser observado na Tabela 24, 25, 27 e 28, de uma forma geral, a presença dos mutantes acarretou em um menor número de estipes e/ou apotécios formados.

Quanto aos resultados da influência dos mutantes sobre as estipes/ou apotécios e a sobrevivência de plantas de alface, as análises de variância (Apêndices 29 e 33) detectaram diferenças significativas dos mutantes na porcentagem de plantas sobreviventes na presença ou ausência dos fungicidas benomil e iprodione. Como pode ser observado na Tabela 26, apenas no Experimento II foram observadas reduções na porcentagem de plantas sobreviventes pela presença de TW5-2B6, TW5-410 e TW5-523. Nos experimentos em presença ou ausência dos fungicidas (Tabela 29), foram observadas diferenças estatísticas quanto às porcentagens de plantas sobreviventes na ausência dos fungicidas e em presença dos mutantes TW5-2B1 (Exp. I) e TW5-2B6 e linhagem selvagem TW5 (Exp. II).

Na cultura de alface, o hábito de crescimento das plantas e a origem das fontes de inóculo (os apotécios e ascosporos), influenciam no controle de *S. sclerotiorum*, mostrando as dificuldades para um efetivo controle químico. Os ascosporos provenientes de apotécios locais limitam o controle químico por aplicações foliares enquanto que os ascosporos aéreos, provenientes de outros campos ou os carregados pela reutilização da água de irrigação, limitam muito a eficácia das aplicações de fungicidas ao solo e do controle local (BEN-YEPHET *et al*, 1986; PATTERSON & GROGAN, 1985; STEADMAN, 1979).

Os fungicidas benomil, PCNB e DCNA, têm se mostrado parcialmente efetivos para minimizar as podridões causadas por *S. sclerotiorum* e *S. minor* (HAWTHORNE & JARVIS, 1973; LETHAM *et al*, 1976; LLOYD, 1975; MARCUM *et al*, 1977). Benomil tem sido o fungicida "padrão" usado no controle da podridão por esclerotinia, mesmo não oferecendo uma proteção completa (STEADMAN, 1979). LETHAM & STOVOLD (1982), ao testarem seis diferentes fungicidas na concentração 2.000ppm, em tratamento

de escleródios, observaram que benomil ou iprodione reduziram as chances de infecções durante a cultura, e retardaram a formação de apotécios por *S. sclerotiorum*. Benomil mostrou-se superior ao iprodione quanto à habilidade em reduzir a sobrevivência dos escleródios e a germinação carpogênica. STEADMAN (1982), utilizando o fungicida benomil, obteve controle da podridão e aumento na produtividade quando o índice de severidade da doença foi de até 25%. Para um índice de severidade intermediário, o fungicida ofereceu um controle parcial. Nos casos em que o índice da severidade foram superiores a 60%, o controle químico foi pouco eficiente. A falta de controle provavelmente deveu-se às altas concentrações do inóculo (ascosporos) e às condições climáticas favoráveis que permitiram a rápida colonização pelos ascosporos (STEADMAN, 1982).

Utilizando aplicações preventivas com o fungicida PCNB, STEADMAN (1982) observou que o número de apotécios formados por *S. sclerotiorum* foram reduzidos significativamente, sem no entanto, incorrer em concomitante redução da doença. O controle do número de escleródios não mostrou ser o fator limitante no controle da doença, devido aos ascosporos oriundos de área vizinhas. Por outro lado, quando o patógeno empregado foi *S. minor*, existiu uma forte correlação entre as populações de escleródios do solo e a incidência da doença. Com a redução do número de escleródios no solo, obteve-se um concomitante decréscimo da doença.

THWIN & MITCHELL (1990) observaram que iprodione e Vinclozolin atrasaram a germinação dos escleródios. Vinclozolin reduziu o número de apotécios por escleródio assim como o número total de apotécios produzidos nos experimentos realizados em 1990. Entretanto, os resultados obtidos em 1989 foram diferentes, provavelmente devido às condições climáticas favoráveis para a germinação carpogênica. Captan e Thiofanato metílico têm sido rotineiramente usado para tratamento de sementes e controlado eficientemente o patógeno (TU, 1989).

Neste enfoque, existe o potencial para o controle biológico de doenças causadas por escleródios, porém no presente, as recomendações práticas não estão disponíveis. O fator mais limitante para o emprego do controle biológico está no fato dos excelentes resultados obtidos *in vitro* não terem mostrado consistência e repetibilidade nas avaliações onde ocorreram variações ambientais e uma forte competição com a microflora indígena (STEADMAN, 1979).

#### 4.6 - CORPORTAMENTO DE MUTANTES DE *T. harzianum* TW5 E *T. harzianum* WT-T95 COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE ALFACE, EM AUSÊNCIA OU PRESENÇA DOS FUNGICIDAS BENOMIL E IPRODIONE.

O uso rotineiro na agricultura de agentes de biocontrole de fitopatógenos ainda não tem sido extensivamente praticado. Uma característica que poderia fazer estes agentes ficarem mais atrativos seria a possibilidade de atuarem melhorando a produção, além do controle dos patógenos. Tais resultados têm sido obtidos por alguns dos agentes de biocontrole (BAKER *et al*, 1984; Baker, 1983, citado por CHANG *et al*, 1986).

A análise de variância (Apêndice 34) detectou diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) no comportamento dos mutantes como promotores de crescimento em plantas de alface, em condições de casa-de-vegetação. Como pode ser observado na Tabela 30, TW5-2B2 apresentou os maiores pesos de matéria fresca, mas não diferiu do TW5-2B1, TW5-2B6 e T95. Estes, não diferiram entre si, dos demais mutantes, linhagens parentais ou controle.

O potencial das espécies de *Trichoderma* como agente de biocontrole já é bem conhecido, porém são poucos os relatos de induções de crescimento de plantas. LINDSEY & BAKER (1967) foram os primeiros a mostrarem um aumento no crescimento de plantas na presença de *T. viride*, em condições de laboratório.

BAKER *et al* 1984) observaram 274% de aumento no peso de matéria seca de plantas de rabanete tratadas com o mutante *T.*

*harzianum* T95. WINDHAM *et al* (1986) observaram que a adição de *T. harzianum* T95 e T12 e *T. koningii* T8 ao solo autoclavado, aumentou tanto a taxa de emergência como o peso de matéria seca das raízes e caules em plantas de tomate e fumo, 213-275 e 259-318%, respectivamente. Em solo natural, *T. harzianum* T95 diferiu do controle e proporcionou aumento no peso de matéria seca de plantas de rabanete. CHANG *et al* (1986) utilizando solo natural, observaram uma antecipação de dois dias na germinação de sementes de pimenta. Empregando solo natural ou pasteurizado, *T. harzianum* T95 aumentou o número de botões por plantas de crisântemo, de petúnia e outras. Existiu um aumento significativo do peso de matéria seca em plantas de tomate, pimenta e pepino quando plantadas em presença de *T. harzianum* T203, em solo arenoso vermelho/marrom. Entretanto, respostas positivas não ocorreram em todos os casos e, plantas de feijão e rabanete não responderam à presença do agente de biocontrole.

LYNCH *et al* (1991) observaram que os isolados *T. harzianum* IMI 298374 e *T. harzianum* WT, exibiram diferenças significativas nas porcentagens de emergência de plântulas e no peso de matéria seca, aos 25 dias. Os autores contrastaram estes resultados com os obtidos por BAKER (1989), onde foram obtidos um pequeno efeito benéfico na promoção do crescimento das plantas de ervilha e rabanete.

PAULITZ *et al* (1990) combinaram os dois agentes de biocontrole *Pythium nunn* (via incorporação ao solo) e *T. harzianum* T95 (via tratamento de sementes) para o controle do fitopatógeno *P. ultimum*, e observaram as interações entre estes dois agentes no aumento do peso de matéria seca de plantas de pepino. Como substrato foram utilizados solos naturais ou pasteurizados, suplementados ou não com folhas de feijão, e provenientes de Nunn, Colorado, e de Willamett, Oregon. Em solos de Colorado, a presença de T95 estimulou o crescimento das plantas, exceto em solo natural suplementado com folhas de feijão. As combinações de T95 e *P. nunn* resultaram em significativos aumentos no peso de matéria seca tanto em solo

natural não suplementado como em solo pasteurizado suplementado com folhas de feijão. Em solo de Oregon, sementes tratadas com T95 foram efetivas apenas em solos pasteurizados, enquanto em solo natural, as combinações dos dois agentes de biocontrole mostraram melhores resultados que cada um dos agentes separadamente, porém em nenhum dos casos as interações foram significativas.

Como comentaram PAULITZ *et al* (1986), ainda continuam desconhecidos se são as diferentes misturas de solo que afetam a receptividade das plantas aos produtos promotores de crescimento produzidos pelo *Trichoderma* spp., ou se os fungos que são influenciados pelos fatores do ambiente do solo na produção de alguns metabólitos secundários.

Apesar dos resultados relatados, pouco se conhece sobre o comportamento de mutantes induzidos como promotores de crescimento de plantas em presença do fungicida ou em controle integrado. Nos dados obtidos neste trabalho, mesmo frente às altas doses dos fungicidas benomil e iprodione, observou-se uma resposta positiva causada por alguns dos mutantes quando comparados com as linhagens selvagens e o controle. As análises de variância (Apêndice 35) detectaram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre os mutantes como promotores do crescimento de plantas na ausência ou presença dos fungicidas assim como para um mutante entre os fungicidas. Como pode ser observado na Tabela 31, na ausência de fungicidas, os maiores pesos de matéria de plantas de alface foram obtidos na presença dos mutantes TW5-2B2, TW5-2B6 e T95, para o Experimento I, e dos mutantes TW5-2B1, TW5-2B2, TW5-2B6, TW5-410, TW5-523 e linhagem selvagem WT-T95, para o Experimento II. Na presença do benomil, somente no Experimento II foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, com destaque para os mutantes TW5-2B6, TW5-410, TW5-523 e T95. Em presença do iprodione, no Experimento I, o melhor resultado foi obtido em presença do mutante TW5-2B6, enquanto que para o Experimento II, destacaram-se TW5-2B6, TW5-410, T95 e linhagem selvagem WT-

## T95. (Tabelas 28 e 29)

Para determinar se a presença de *T. harzianum* T95 resultaria numa resposta de crescimento de plantas de crisântemos, CHANG *et al* (1986) usou o controle integrado quando, na época do transplante os talos foram tratados com uma suspensão de conídios do antagonista, hormônio de enraizamento e/ou uma suspensão de benomil, antes de serem transferidas ao meio de propagação. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao peso de matéria seca das plantas. Entretanto, foram observados aumentos no número de botões e aumentos na altura e pesos de matéria seca de plantas quando o inóculo de T95 (20%) foi incorporado ao meio de propagação.

Os trabalhos com agentes de biocontrole ao serem analisados, permitem observar que os resultados apresentados são muito diversificados, mostrando influenciar de forma positiva, negativa ou neutra o desenvolvimento das plantas. Continua desconhecido como interagem os vários fatores mediadores destas respostas. Investigações preliminares têm mostrado que fatores diversos afetam a expressão da resposta de crescimento pela plantas, como: fertilidade (WINDHAM *et al*, 1986), idade das plantas (PAULITZ *et al*, 1986), composição do solo ou substrato (CHANG *et al*, 1986), o veículo e a forma de introdução dos antagonistas (KLEIFELD & CHET, 1992) e temperatura (KNUDSEN *et al*, 1991).

Hoje, porém, já são conhecidos alguns dos fatores de promoção do crescimento de plantas por bactéria e fungos, tais como: controle de patógenos menores na rizosfera; produção de hormônios de plantas; produção de vitaminas ou outros materiais nas formas utilizáveis pelas plantas; liberação de nutrientes do solo e matéria orgânica e, absorção e translocação aumentada de minerais (KLEIFELD & CHET, 1992). Apenas dois destes mecanismos parecem importantes na promoção de crescimento de plantas induzidos por *Trichoderma* spp. O primeiro, está relacionado com o controle indireto dos "patógenos menores", ou seja, microrganismos cuja presença nas pontas das raízes ou

células corticais, como parasitas ou produtores de compostos tóxicos, com efeitos deletérios às plantas; o segundo fator está relacionado com a excreção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (BAKER, 1989).

Desta forma, os mutantes resistentes ao benomil de *T. harzianum* TW5, como o de *T. harzianum* WT-T95, mostraram-se promissores como promotores de crescimento de plantas. Além de proporcionarem um aumento no peso de matéria seca das plantas de alface, exibiram capacidade para crescerem em presença de quitina e laminarina (produzindo as enzimas necessária para a atividade micoparasítica sobre micélio de fitopatógenos), assim como, mostraram habilidades para degradar fibras de celulose, celobiose, carboxi-metil celulose e glucose (indicações de uma possível competência de rizosfera).

## 5 - CONCLUSÕES

Dos estudos realizados, nas condições de laboratório e casa-de-vegetação, foram obtidas as seguintes conclusões:

. os mutantes auxotróficos TW5-410 e TW5-523 mostraram alta resistência ao fungicida benomil;

. pelos testes de antagonismo em confrontação direta, os mutantes e linhagens selvagens TW5 e WT-T95 rediziram a produção de escleródios;

. nos testes de hiperparasitismo de escleródios de *S. sclerotiorum*, todos os mutantes e linhagens selvagens não mostraram atividade hiperparasítica;

. os mutantes, com exceção do TW5-2B1, exibiram os maiores pesos de matéria seca frente à fonte de carbono Laminarina. Frente às fontes de carbono fibras de algodão, celobiose, carboxi-metil celulose e glucose, os mutantes mostraram-se superiores à linhagem selvagem TW5; enquanto T95 mostrou-se superior à linhagem selvagem WT-T95 quando frente à fibra de algodão e celulose microcristalina;

. os mutantes e linhagens selvagens TW5 e WT-T95 exibiram uma atividade antagônica de micélio de *S. minor* sobre aipo;

. os mutantes e linhagens selvagens TW5 e WT-T95 reduziram o número de estipes e/ou apotécios produzidos por *S. sclerotiorum*;

. o mutante TW5-2B2, seguido por TW5-2B1, TW5-2B6 e T95, comportaram-se como promotores de crescimento de plantas de alface.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, G.S. & GROGAN, R.G. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture in infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, **65**: 300-9, 1975.
- ABAWI, G.S. & GROGAN, R.G. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, **69**: 899-904, 1979.
- ABAWI, G.S.; POLACH, F.J.; MOLIN, W.T. Infection of bean by ascospores of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, **65**: 673-8, 1975.
- ABD-EL MOITY, T.Y.; PAPAVIDAS, G.C.; SHAYLA, M.N. Induction of new isolates of *Trichoderma harzianum* tolerant to fungicides and their experimental use for control of wilt-rot of onion. *Phytopathology*, St. Paul, **72**: 396-400, 1982.
- ADAMS, P.B. Factors affecting survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Plant Disease Report*, St. Paul, **59**: 599-603, 1975.
- ADAMS, P.B. Comparison of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, **79**: 1345-7, 1989.
- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Ecology of antagonists of *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, **69**: 896-9, 1979.
- ADAMS, P.B. & AYERS, W.A. Biological control of sclerotinia lettuce drop in the field by *Sporodesmium sclerotivorum*. *Phytopathology*, St. Paul, **72**: 485-8, 1982.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, **77**:

358-62, 1987a.

- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Growth of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum* on carbon substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 34: 807-14, 1987b.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, St. Paul, 77: 1982-9, 1987c.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 34: 229-34, 1988a.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 34: 694-6, 1988b.
- AHMAD, J.S. & BAKER, R. Growth of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum* on carbon substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 34: 807-14, 1988c.
- ALEXOPOULOS, C.J. & MINS, C.W. *Introductory mycology*. 3.ed. New York, John Wiley & Sons, 1979. 632p.
- AMARAL, D.; COSTA, S.O.P.; SCHWAB, A.; OLIVEIRA, E.N.S.; BRANCO, C.L.; CURY, A.; TRAVASSOS, L.R. *Experimentos de microbiologia geral*. 3.ed. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1967. 170p.
- ARTIGUES, M. & DAVET, P. Comparaison des aptitudes parasitaires de clones de *Trichoderma* vis-à-vis de quelques champignons a sclerotes. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 16: 413-7, 1984.
- AYERS, W.A. & ADAMS, P.B. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* species by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, 25: 17-20, 1979.
- AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético e preservação de fungos utilizados no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. *Controle biológico de doenças de plantas*. Brasília, EMBRAPA/CNPDA, 1991. p.236-51. (Documentos, 15.).
- AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Nacional, 1973. 288p.
- BACKMAN, P.A. & RODRIGUES-KABANA, R. A system for the growth

and delivery of biological control agents to the soil. *Phytopathology*, St. Paul, **65**: 819-21, 1975.

- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BAKER, K.F. Envolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, **25**: 67-85, 1987.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. *Biological of plant pathogens*. San Francisco, W.H. Frieman, 1974. 433p.
- BAKER, R. Molecular biology in biology control of soilborne patogens. In: ARNTZEN, C.J. & RYAN, C., ed. *Molecular strategies for crop protection*. New York, Alan R. Liss, 1987a. p.115-24.
- BAKER, R. Mycoparasitism: ecology and physiology. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, **9**: 370-9, 1987b.
- BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivy. *Trends in Biotecnology*, Cambridge, **7**: 34-8, 1989.
- BAKER, R. & DICKMAN, M.B. Biological control with fungi. In:           . *Soil Microbial Ecology*, New York, Blaine Metting, F. Marcel Dekker, 1992. p.275-306.
- BAKER, R.; ELAD, Y.; CHET, I. The controlled experiments in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology*, St. Paul, **74**: 1019-21, 1984.
- BARNETT, H.L. The nature of mycoparasitism by fungi. *Anual Review of Microbiology*, Palo Alto, **17**: 1-14, 1963.
- BARNETT, H.L. & BINDER, F.L. The fungal host-parasite relationship. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, **16**: 273-92, 1973.
- BARROS, I.B.I. Reação de *Lactuca* sp ao *Sclerotinia minor* Tagger e hibridação interespecífica no gênero *Lactuca*. Piracicaba, 1988. 167p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against sex fungal plant pathogens. *Phytopathology*, St. Paul, **72**: 379-82, 1982.
- BENSACI, M. & NEUMANN, P. Selection of *Trichoderma* spp. strains as biocontrol agents, resistant to fungicides.

- (Abstract). Canadian Journal of Plant Pathology, Ottawa, 11: 185-6, 1989.
- BEN-YEPHET, Y.; BITTON, S.; GREENBERGER, A. Control of lettuce crop disease, caused by *Sclerotinia sclerotiorum* with metham-sodium soil treatment and foliar application of Benomyl. *Plant Pathology*, London, 35: 146-51, 1986.
- BOOSALIS, M.C. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 2: 363-75, 1964.
- BUDGE, S.P. & WHIPPS, J.M. Glasshouse trials of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for the biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in celery and lettuce. *Plant Pathology*, London, 40: 59-66, 1991.
- BURDON, J.J. & CHOILVERS, G.A. Host density as a factor in plant disease ecology. *Annual Review of Plant Pathology*, Palo Alto, 20: 143-66, 1982.
- CHANG, Y.; CHANG, Y.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, St. Paul, 70: 145-8, 1986.
- CHAO, W.L.; NELSON, E.B.; HARMAN, G.E.; HOCH, H.C. Colonization of the rhizosphere by biological control agents applied to seeds. *Phytopathology*, St. Paul 76: 60-5, 1986.
- CHAVES, G.M. Estudos sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary. *Experientiae*, Viçosa, 4: 1-133, 1961.
- CHET, I. & ELAD, Y. Mechanism of mycoparasitism. In: Les antagonismes microbiens. Mode d'action et application a la lutte biologique controle les maladies des plantes. Bordeaux, 1983, Colloque de I.N.R.A., Paris, 18: 35-40, 1983.
- CHET, I. & HENIS, Y. Effect on catechol and disodium EDTA on melanin content of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and the role of melanin in the susceptibility of these walls to  $\beta$ -(1,3)-glucanase and chitinase. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 1: 131-8, 1969.
- CHET, I.; HADAR, Y.; ELAD, Y.; KATAN, J.; HENIS, Y. Biological control of soil-borne pathogens by *Trichoderma harzianum*. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W., ed. Soil-borne plant pathogens. New York, Academic Press, 1979. p. 585-91.

- CLAYDON, N.; ALLAN, M.; HANSON, J.R.; AVENT, G.A. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transaction British Mycology Society, Cambridge*, 88: 503-13, 1987.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, American Phytopathology Society, 1983. 539p.
- COOK, G.E.; STEADMAN, J.R.; BOOSALIS, M.G. Survival of *Whetzelinia sclerotiorum* and initial infection of dry edible beans in Western Nebraska. *Phytopathology, St. Paul*, 65: 250-5, 1975.
- CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J.M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J.A.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on  $\beta$ -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Archives of Microbiology, Berlin*, 159: 316-22, 1993.
- DAVET, P. Activité parasitaire des *Trichoderma* vis-à-vis des champignons à sclérotés; corrélation avec l'atitude à la compétition dans un sol non stérile. *Agronomie, Paris*, 6: 863-7, 1986.
- DAVET, P. Criteria for selecting *Trichoderma* clones antagonistic to sclerotia fungi in soil. *Bulletin OEPP, Paris*, 17: 535-40, 1987.
- DAVET, P.; ARTIGUES, M.; MARTIN, C. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie, Paris*, 1: 933-6, 1981.
- DAVIDSE, L.C. & FLACH, W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl-carbamate to fungal tubulin as mechanism of resistance to this antimicotic agent in mutant strain of *Aspergillus nidulans*. *Cell Biology, London*, 72: 174-93, 1977.
- DEKKER, J. & GEORGOPOULOS, S.G. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1982. 265p.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transaction of British Mycology Society, Cambridge*, 57: 41-8, 1971a.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of British Mycology Society, Cambridge*, 57: 41-8, 1971b.

- DICKENS, L.E. & OSHIMA, N. White mold of beans. Service in Action. Colorado State University Extension Service no. 2.918, 1975.
- DOW, R.L.; PORTER, D.M.; POWELL, N.L. Effect of environmental factors on *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia blight* of peanut. *Phytopathology*, St. Paul, 78: 672-6, 1988.
- DUTTA, K. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control *Verticillium* Wilt. *Plant and Soil*, St. Paul, 63: 209-16, 1981.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, St. Paul, 61: 42-4, 1971.
- ELAD, Y. Reason for the delay in development of biological control of foliar pathogens. *Phytoparasitica*, Bel Dagan, 18: 99-105, 1990.
- ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 16: 381-6, 1984.
- ELAD, Y.; BARAK, R.; CHET, I.; HENIS, Y. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi. *Phytopathology Zeitschrift*, Berlin, 107: 168-75, 1983a.
- ELAD, Y.; CHET, I.; BOYLE, P.; HENIS, Y. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* - scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 85-8, 1983b.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 28: 719-25, 1982.
- ELAD, Y.; CHET, I.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum*. A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 119-21, 1980.
- ELAD, Y.; SADOWSKY, Z.; CHET, I. Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transaction of British Mycology Society*, Cambridge, 88: 259-62, 1987.
- ELAD, Y.; ZIMAND, G.; ZAQS, Y.; ZURIELL, S.; CHET, I. Use of

- T. harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mold (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, London, **42**: 324-32, 1983c.
- ENARI, T.M. Microbial cellulases. In: FOGARTY, W.M., ed. *Microbial enzymes and biotechnology*. London, Applied Science Publ., 1983. p.188-91.
- FOSTER, R.C.; ROVIRA, A.D.; COOK, T.W. Ultrastructure of the root-soil interface. St. Paul, The American Phytopathology Society, 1983. 157p.
- FUNGARO, M.H.P. Caracterização genética e dados citológicos em *Aspergillus niger* Van Tüghem e *Aspergillus awamori* Nakazawa. Piracicaba, 1984. 134p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FUNGARO, M.H.L. Genética e melhoramento de *Candida* sp para a produção de coalho microbiano. Piracicaba, 1990. 119p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GHINI, R. Resistência de fungos à fungicidas do grupo dos benzimidazóis e dicarboximidas; uma revisão. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. 21p. (Documento,9)
- GROGAN, R.G. *Sclerotinia* species: summary and comments on needed research. *Phytopathology*, St. Paul, **69**: 908-10, 1979.
- GROGAN, R.G. & ABAWI, G.S. Influence of water potential on growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, **65**: 122-8, 1975.
- GULLINO, M.L. & GARIBALDI, A. Biological and integrated control of grey mold of grape in Italy. *Trichoderma Newsletter*, Coventry, (4): 4, 1988.
- HAAS, J.H. & BOLWYN, B. Ecology and epidemiology of *Sclerotinia* wilt of white beans in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, **52**: 525-33, 1972.
- HAAS, J.H. & BOLWYN, B. Predictiong and controlling white mold epidemics on white mold. *Canada Agriculture*, Ottawa, **18**: 28-9, 1973.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat-bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Palo Alto, **69**: 64-8, 1979.

- HARMAN, G.E. & HADAR, Y. Biological control of *Pythium* spp. *Seed Science Technology*, Zurich, 11: 893-906, 1983.
- HARMAN, G.E.; TAYLOR, A.G.; STASZ, T.E. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Disease*, St. Paul, 73: 631-7, 1989.
- HAWTHORNE, B.T. Production of apothecia of *Sclerotinia minor*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 16: 559-60, 1973.
- HAWTHORNE, B.T. *Sclerotinia minor* on lettuce: effect of plant growth on susceptibility to infection. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 17: 387-92, 1974.
- HAWTHORNE, B.T. & JARVIS, W.R. Differential activity of fungicides on various stages in the life cycle of *Sclerotinia* spp. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, 16: 551-7, 1973.
- HENIS, Y.; LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C. Interactions between *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* spp. relationship between antagonism and disease control. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 16: 371-5, 1984.
- HOES, J.A. & HUANG, H.C. *Sclerotinia sclerotiorum* viability and separation of sclerotia from soil. *Phytopathology*, St. Paul, 65: 1431-2, 1975.
- HUANG, H.C. Control of sclerotinia wilt of sunflowers by hyperparasites. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Guelph, 2: 26-32, 1980.
- HUANG, H.C. & KOZUB, G.C. Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botany Bulletin Academica Sinica*, Taipei, 32: 279-86, 1991.
- HUANG, H.C. & KOZUB, G.C. Influence of inoculum production temperature on carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 39: 548-50, 1993.
- IMOLEHIN, E.D.; GROGAN, R.G.; DUNIWAY, J.M. Effect of temperature and moisture tension on growth, sclerotial production, germination and infection by *Sclerotinia minor*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 1153-7, 1980.
- JONES, D. Ultrastructure and composition of the cell walls



- of *Sclerotinia sclerotiorum*. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 54: 351-60, 1970.
- JONES, D.; GORDON, A.H.; BACON, J.S.D. Co-operative action by endo- and exo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanases from parasitic fungi in the degradation of cell-wall glucans of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Biochemical Journal, London, 140: 47-55, 1974.
- KISSMANN, K.G. *Sclerotinia*. Atualidades Agrícolas, 4: 16-9, 1988.
- KLEIFELD, O. & CHET, J. *T. harzianum* - interactions with plants and effect on growth response. Plant and Soil, Dordrech, 144: 267-72, 1992.
- KNOWLES, J.; LEHTOVAARA, P.; TEERI, T. Cellulase families and their genes. Trends in Biotechnology, Cambridge, 5: 255-61, 1987.
- KNUDSEN, G.R.; ESCHEN, D.J.; DANDURAND, L.M.; WANG, Z.G. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 57: 2864-7, 1991.
- KOHN, L.M. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon, Ithaca, 9: 365-444, 1979a.
- KOHN, L.M. Delimitation of the economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology, St. Paul, 69: 881-6, 1979b.
- KRAFT, J.M. & PAPAIVIZAS, G.C. Use of host resistance, *Trichoderma*, and fungicides to control soilborne diseases and increase seed yields of peas. Plant Disease, St. Paul, 67: 1234-7, 1983.
- LETHAM, D.B. & STOVOLD G.E. The effect of fungicides on germination and survival of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Australian workshop on *Sclerotinia* diseases and their control. Newton, Tansmania, Department of Agriculture, 30-31 march, 1982. p. 24-5.
- LETHAN, D.B.; HURTT, D.O.; TRIMBOLI, D.S. Biology and control of *Sclerotinia sclerotiorum* in cauliflower and tomato crop in coastal New South Wale. Plant Disease Reporter, St. Paul, 60: 286-9, 1976.
- LeTOURNEAU, D. Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. Phytopathology, St. Paul, 69: 881-90, 1979.
- LINDSEY, D.L. & BAKER, R. Effect of certain fungi on dwarf

tomatoes grown under gnotobiotic conditions.  
**Phytopathology**, St. Paul, 57: 1262-3, 1967.

- LIU, S. The use of benomyl resistant mutant of *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent against root rot disease of chrysanthemum and adzuki bean. **Trichoderma Newsletter**, Coventry, (4): 5, 1988.
- LLOYD, E.H. Fungicidal control of *Sclerotinia* white mold in pinto beans. North Dakota Agriculture Experimental Station, Reprint sept-oct., 838. **Farm and Food Research**, Dublin, 32: 21-3, 1974.
- LLOYD, E.H. White mold of pintos beans: effects on yield and fungicidal control. North Dakota Agriculture Experimental Station. **Farm and Food Research**, Dublin, 32: 9-14, 1975.
- LUMSDEN, R.D. Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *sclerotinia* species. **Phytopathology**, St. Paul, 69: 890-6, 1979.
- LYNCH, J.M. *In vitro* identification of *Trichoderma harzianum* as a potential antagonist of plant pathogens. **Current Microbiology**, New York, 16: 49-53, 1987.
- LYNCH, J.M.; WILSON, K.L.; OUSLEY, M.A.; WHIPPS, J.M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, 12: 59-61, 1991.
- MARCUM, D.B.; GROGAN, R.G.; GRETEATHEAD, A.S. Fungicide control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* "minor". **Plant Disease Reporter**, St. Paul, 61: 555-9, 1977.
- MCCREDIE, T.A. & SIVASITHAMPARAM, K. Fungi mycoparasitic on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in some Western Australian soil. **Transaction of the British Mycological Society**, Cambridge, 84: 736-9, 1985.
- MELO, I.S. Obtenção de novos biótipos de *Trichoderma viride* antagônicos à *Sclerotinia minor* Tagger. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. **Anais**. Piracicaba, FEALQ, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. p.101.
- MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., org. **Controle biológico de doenças de plantas**. CNPDA /EMBRAPA, 1991. p.135-156. (Documentos, 15.).
- MELO, I.S. & HEALE, J.B. Isolamento e regeneração de protoplastos de *Trichoderma pseudokoningii*, um agente de

- biocontrole de fitopatógenos. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 12, Araras, 1989. Resumos. Araras, 1989. p.34.
- MELO, I.S. & SILVA, A.C. Resistance of U.V. induced mutants of *Trichoderma harzianum* to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Petria*, Roma, 1: 151-2, 1991.
- MENTEN, J.O.M.; MACHADO, C.C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. *in vitro*. In: CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 9., Campinas, 1976. Resumos. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 1: 57-66, 1976.
- MERRIMAN, P.R. Survival of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 8: 385-9, 1976.
- MORRALL, R.A.A. & DUECK, J. Epidemiology of sclerotinia stem rot of rapeseed in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology*, Ottawa, 4: 1661-8, 1982.
- MUELLER, J.D.; CLINE, M.N.; SINCLAIR, J.B.; JACOBSEN, B.J. An *in vitro* test for evaluating efficacy of mycoparasites on sclerotinia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, St. Paul, 69: 584-7, 1985.
- NATTI, J.J. Epidemiology and control of bean white mold. *Phytopathology*, St. Paul, 61: 669-74, 1971.
- NIPOTI, P.; SPORTELLI, M.; D'ERCOLE, N. Lotta biologica al marciume del colletto della lattuga (*Sclerotinia minor*) coltivata en serra. *Informatore Fitopatologico*, Bologna, 33: 71-4, 1983.
- OADES, J.M. Mucilages at the root surface. *Journal of Soil Science*, Oxford, 29: 1-16, 1978.
- PAPAVIZAS, G.C. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizosphere. *Phytopathology*, St. Paul, 71: 121-5, 1981.
- PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 23: 23-6, 1985.
- PAPAVIZAS, G.C. & LEWIS, J.A. Physiological and bicontrol characteristics of stable mutants of *Trichoderma viride* resistant to MBC fungicides. *Phytopathology*, St. Paul, 73: 407-11, 1983.

- PAPAVIZAS, G.C.; LEWIS, J.A.; MOITY, A.E. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhance biocontrol capabilities. *Phytopathology*, St. Paul, **72**: 126-32, 1982.
- PARTYKA, R.E. & MAI, W.F. Effects of environment and some chemicals on *Sclerotinia sclerotiorum* in laboratory and potato field. *Phytopathology*, St. Paul, **52**: 766-70, 1962.
- PATTERSON, C.L. & GROGAN, R.G. Cause and control of lettuce crop in California. Davis, University of California/ Department of Plant Pathology. 1984.
- PATTERSON, C.L. & GROGAN, R.G. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, St. Paul, **69**: 766-70, 1985.
- PAULITZ, T.C.; AHMAD, J.S.; BAKER, R. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological of *Pythium* damping-off of cucumber. *Plant and Soil*, Dordrecht, **121**: 243-50, 1990.
- PAULITZ, T.C.; WINDHAM, M.; BAKER, R. Effect of peat:vermiculite mixes containig *Trichoderma harzianum* on increased growth response of radish. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Geneva, **111**: 810-6, 1986.
- PERES, E. & MELO, I.S. Variabilidade em *Trichoderma harzianum*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. *Anais*. Piracicaba, FEALQ, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. 99p.
- PETERBAUER, C.K.; HEIDENREICH, E.; BAKER, R.; KUBICEK, C.P. Effect benomyl and benomyl resistance on cellulase formation by *Trichoderma reesei* and *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, **38**: 1292-7, 1992.
- PHILLIPS, A.J.L. *Gliocladium virens*: a hyperparasite of *sclerotinia sclerotiorum*. *Phytophylactica*, Bel Dagan, **18**: 35-7, 1986a.
- PHILLIPS, A.J.L. Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. *Phytophylactica*, Bel Dagan, **19**: 406-10, 1986b.
- PHILLIPS, A.J.L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. *Phytophylactica*, Bel Dagan, **21**: 135-9, 1989.
- PICININI, E.C. Fungicidas benzimidazoles. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C., ed.

- Revisão anual de patologia de Plantas, Porto Alegre,  
Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994. p.357-410.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMON, C.M.; McDONALD, K.D.;  
BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*.  
*Advance in Genetics*, San Diego, 5: 141-238, 1953.
- PURDY, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history disease and  
symptomatology, host range, geographic distribution and  
impact. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 875-80, 1979.
- PURDY, L.H. & BARDIN, R. Mode of infection of tomato plants  
by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease  
Report*, St. Paul, 37: 361-2, 1953.
- REESE, E.T. & MANDELS, M.  $\beta$ -D-1,3 Glucanases in fungi.  
*Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 5: 173-85, 1959.
- RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*.  
*Mycological Papers*, Wallingford, 116: 1-56, 1969.
- ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de  
fitopatógenos. In: BETTIOL, W., org. Controle biológico  
de doenças de plantas. Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1991.  
p.121-34. (Documentos, 15.).
- SANTOS, A.F. & DHINGRA, D.D. Pathogenicity of *Trichoderma*  
spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*.  
*Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 60: 472-5, 1982.
- SAWANT, I.S. & MUKHOPADHYAY, A.N. Integration of Metalaxyl  
with *Trichoderma harzianum* for the control of *Pythium*  
damping-off in sugarbeet. *Indian Phytopathology*, New  
Delhi, 43: 535-41, 1990.
- SCHWARTZ, H.F. & STEADMAN, J.R. Factors affecting sclerotium  
populations of, and apothecium production by *Sclerotinia  
sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, 68: 383-8, 1978.
- SCHWARTZ, H.F. & STEADMAN, J.R. White mold. In: SCHWARTZ,  
H.F. & PASTOR-CORRALES, M.A., ed. Bean production problems  
in the tropics. 2.ed. Cali, CIAT, 1989. p.211-30.
- SILVA, A.C.F. Obtenção e caracterização de novos biótipos de  
*Trichoderma harzianum* Rifai, resistentes a benzimidazóis,  
através de luz ultravioleta. Piracicaba, 1991. 131p.  
(Mestrado -Escola Superior de Agricultura "Luiz de  
Queiroz"/USP).
- SILVA, A.C.F. & MELO, I.S. Mutantes de *Trichoderma harzianum*  
resistentes a Iprodione e antagônicos ao *Sclerotinia  
minor*. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE CONTROLE BIOLÓGICO DE

- DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. Anais. Piracicaba, FEALQ, Jaguariúna, EMBRAPA/CNPDA, 1989. p.102.
- SILVEIRA, W.D. & AZEVEDO, J.L. Isolation of auxotrophic mutants of *Metarhizium anisopliae* by filtration enrichment technique. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, 7: 1-8, 1984.
- SINGH, D. Biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Trichoderma harzianum*. *Tropical Pest Management*, London, 37: 374-8, 1991.
- SIVAN, A. & CHET, I. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*, Reading, 135: 675-82, 1989.
- STEADMAN, J.R. Control of plant disease caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, St. Paul, 69: 904-7, 1979.
- STEADMAN, J.R. Research on the epidemiology and control of *Sclerotinia* diseases in the United States with emphasis on white mold of bean. In: Australian Workshop on *Sclerotinia* Diseases and their control. Newton, Tasmania, Department of Agriculture, 30-31 march, 1982. p.17-9.
- STEADMAN, J.R. White mold - A serious yield limiting disease of bean. *Plant Disease*, St. Paul, 67: 346-50, 1983.
- STEADMAN, J.R.; MAIER, C.R.; SCHWARTZ, H.F. Implication of bean pathogen contamination of irrigation water. *Annual Reporter Bean Improvement Cooperative*, Lincoln, 18: 75-6, 1975.
- SULTAN, Y. Effect of mucilage substrate on germination and growth of wild types and rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. Fort Collins, CO, 1994, 37p. (PhD-Colorado State University).
- SUTTON, J.C. & PENG, G. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 31: 473-93, 1993.
- THWIN, M.N. & MITCHELL, S.J. Effects of seed treatments on sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Brighton Crop Protection Conference - Pests & Disease, 1990. p. 795-800.
- TRUTMANN, P. & KEANE, P.J. *Trichoderma koningii* as a biological control agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in southern Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 22: 43-50, 1990.

- TU, J.C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, St. Paul, 70: 670-4, 1980.
- TU, J.C. Management of white mold in Ontario. *Plant Disease*, St. Paul, 73: 281-5, 1989.
- UPADHYAY, J.P. & MUKHOPADHYAY, A.N. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in sugarbeet. *Tropical Pest Management*, London, 32: 215-20, 1992.
- VARNER, G.V. What we know about white mold control. *Michigan Dry Bean Digest*, Michigan, 17: 11-2, 1992.
- WHIPPS, J.M. Behavior of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments. *Journal of General Microbiology*, Ottawa, 133: 1495-50, 1987.
- WIJETUNGA, C.; STACK, R.W.; BAKER, R. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in an unmodified loamy soil. *Phytopathology*, St. Paul, 74: 862-3, 1984.
- WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, St. Paul, 776: 518-21, 1986.
- WU, W.S. Antibiotic and mycoparasitic effects of several fungi against seed and soil-borne pathogens associated with wheat and oats. *Botany Bulletin Academia Sinica*, Taipei, 18: 25-31, 1977.
- ZAZZARINI, A. & TOSI, L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, London, 34: 415-21, 1985.
- ZHOU, T. & REELEDER, R.D. Application of *Epicoccum purpurascens* spores to control white mold of snap beans. *Plant Disease*, St. Paul, 73: 639-42, 1989.

## TABELAS



Tabela 1 - Frequência de obtenção de mutantes morfológicos e auxotróficos de *T. harzianum* TW5.

| Tratamentos                  | # colônias analisadas | Tipos de mutantes | # de mutantes | frequência de mutante |
|------------------------------|-----------------------|-------------------|---------------|-----------------------|
| Isolamento total             | 3920                  | morfológico       | 29            | 0,0074                |
|                              |                       | auxotrófico       | 0             | 0,0000                |
| Enriquecimento por filtração | 703                   | morfológico       | 0             | 0,0000                |
|                              |                       | auxotrófico       | 12            | 0,0199                |
|                              | 4623                  |                   | 41            | 0,0273                |

Tabela 2 - Mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 estão apresentados com suas respectivas marcas auxotróficas e o número de colônias analisadas para o teste de estabilidade genética pela presença de setores formados.

| Mutantes | Marcas Auxotróficas | Colônias analisadas | Mutantes | Marcas Auxotróficas | Colônias Analisadas |
|----------|---------------------|---------------------|----------|---------------------|---------------------|
| TW5-612  | met                 | 93                  | TW5-574  | arg                 | 75                  |
| TW5-537  | leu                 | 66                  | TW5-560  | arg                 | 93                  |
| TW5-533  | leu                 | 57                  | TW5-609  | arg                 | 66                  |
| TW5-523  | rib, bio            | 75                  | TW5-534  | arg                 | 48                  |
| TW5-600  | met, cis, arg       | 66                  | TW5-555  | arg                 | 60                  |
| TW5-410  | met, cis, arg       | 75                  |          |                     |                     |

arg=arginina; bio=biotina; cis=cisteína ; leu=leucina; met= metionina; rib=riboflavina.

Tabela 3 – Verificação de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 quanto ao crescimento radial em dois meios de cultura.

| Mutantes | Crescimento radial (cm) |            |         |               |         |         |
|----------|-------------------------|------------|---------|---------------|---------|---------|
|          | Meio de BDA             |            |         | Meio de Aveia |         |         |
|          | 24h.                    | 48h.       | 72h.    | 24h.          | 48h.    | 72h.    |
| TW5      | 2.40cA                  | 6.26bAB    | 8.50aA  | 2.73cA        | 6.53bA  | 8.50aA  |
| TW5-534  | 2.43cA                  | 4.70bCDE   | 8.50aA  | 1.80cABC      | 5.50bAB | 8.50aA  |
| TW5-555  | 2.17cAB                 | 6.07bAB    | 8.50aA  | 2.13cAB       | 6.17bAB | 8.50aA  |
| TW5-560  | 2.30cA                  | 6.43bAB    | 8.50aA  | 2.33cAB       | 6.50bA  | 8.50aA  |
| TW5-574  | 1.97cAB                 | 5.87bABC   | 8.43aA  | 1.50cABC      | 6.27bAB | 8.50aA  |
| TW5-612  | 1.67cAB                 | 5.43bABCD  | 8.50aA  | 1.23cBCD      | 5.13bBC | 7.90aAB |
| TW5-523  | 1.50cAB                 | 5.03bBCDE  | 8.50aA  | 2.20cAB       | 5.67bAB | 8.50aA  |
| TW5-609  | 1.50dAB                 | 4.40cDE    | 7.33bAB | 0.00eD        | 5.37cAB | 8.50aA  |
| TW5-410  | 1.47cAB                 | 5.27bABCDE | 8.50aA  | 1.93cABC      | 6.00bAB | 8.50aA  |
| TW5-533  | 1.13cABC                | 4.07bEF    | 8.13aAB | 1.20cBCD      | 4.93bB  | 8.50aA  |
| TW5-600  | 0.87eBC                 | 3.10dFG    | 5.60cC  | 0.63eCD       | 3.53dC  | 7.10bBC |
| TW5-537  | 0.00dC                  | 2.17cG     | 6.93bBC | 0.00dD        | 2.03cD  | 6.27bC  |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) Média de três repetições.

Tabela 4 – Verificação de mutantes de *T. harzianum* TW5 quanto à esporulação nos meios de cultura BDA e Aveia.

| Mutantes | Conídios produzidos ( $10^6/ml$ ) |           |         |            |           |  |
|----------|-----------------------------------|-----------|---------|------------|-----------|--|
|          | BDA                               |           | AVEIA   |            | AVEIA     |  |
| TW5-600  | 45.300aA                          | 15.233bAB | TW5-612 | 6.133bDEF  | 20.200aAB |  |
| TW5-537  | 38.000aAB                         | 20.700bAB | TW5-534 | 4.153bDEFG | 18.067aAB |  |
| TW5-533  | 22.633aBC                         | 22.300bAB | TW5-410 | 3.643aEFG  | 3.340bD   |  |
| TW5-560  | 19.933bC                          | 29.333aA  | TW5-609 | 3.403bEFG  | 14.300aBC |  |
| TW5-523  | 13.400bCD                         | 15.633aAB | TW5     | 1.637bFG   | 4.733aCD  |  |
| TW5-555  | 12.200bCDE                        | 26.133aAB | TW5-574 | 0.14bG3    | 2.233aA   |  |

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula para vertical e minúscula para horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ) Média de três repetições.

Tabela 5 – Redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* #1, por mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5, *in vitro*.

| Redução do crescimento micelial (%) |        |         |          |         |         |
|-------------------------------------|--------|---------|----------|---------|---------|
| Mutantes                            | Exp. I | Exp. II | Mutantes | Exp. I  | Exp. II |
| <i>S. sclero.</i> #1                | 0.00b  | 0.00b   | TW5-534  | 10.98b  | 10.98b  |
| TW5-600                             | 0.00b  | 0.00b   | TW5-537  | 11.37b  | 5.49b   |
| TW5-533                             | 0.00b  | 0.00b   | TW5      | 2.12b   | 2.12b   |
| TW5-560                             | 0.00b  | 0.00b   | TW5-612  | 33.33b  | 0.00b   |
| TW5-574                             | 1.1b   | 0.00b   | TW5-555  | 100.00a | 0.00b   |
| TW5-609                             | 5.10b  | 5.10b   | TW5-523  | 100.00a | 100.00a |
| TW5-410                             | 8.24b  | 8.24b   |          |         |         |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Média de três repetições.

Tabela 6 – Atividade celulolítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 pelo método semi-quantitativo, e empregando *T. reesei* QM9414 como linhagem-padrão.

| Mutantes | Atividade celulolítica | Mutantes | Atividade celulolítica |
|----------|------------------------|----------|------------------------|
| TW5-600  | 0.3930 a               | TW5-523  | 0.0790 d               |
| TW5-2B6  | 0.2880 b               | TW5-555  | 0.0790 d               |
| TW5-2B2  | 0.1833 c               | TW5-410  | 0.0790 d               |
| TW5-2B1  | 0.1833 c               | TW5-612  | 0.0790 d               |
| TW5-560  | 0.1570 c               | TW5-574  | 0.0790 d               |
| QM9414   | 0.1570 c               | TW5-537  | 0.0790 d               |
| TW5      | 0.0790 d               | TW5-534  | 0.0790 d               |
| TW5-533  | 0.0790 d               | TW5-609  | 0.0263 d               |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Média de três repetições. A atividade celulolítica foi expressa pela área total do halo de degradação:  $\pi/4 \times (D^2 - d^2)$ .

Tabela 7 – Crescimento micelial de mutantes dos *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em meio de cultura suplementado com Laminarina, Quitina ou Celobiose.

| Mutantes | Peso de matéria sêca (mg) <sup>1</sup> |           |         |            |           |          |
|----------|--|-----------|---------|------------|-----------|----------|
|          | Laminarina                             |           | Quitina |            | Celobiose |          |
|          | 0 g/l                                  | 2 g/l     | 0 g/l   | 2 g/l      | 0 g/l     | 2 g/l    |
| TW5      | 0.65aA                                 | 23.10bC   | 1.93aA  | 104.35bABC | 1.89aA    | 10.33bC  |
| TW5-2B1  | 0.75aA                                 | 32.80bABC | 2.11aA  | 172.24bAB  | 2.20aA    | 60.76bAB |
| TW5-2B2  | 0.78aA                                 | 48.89bA   | 2.23aA  | 99.90bBC   | 2.14aA    | 54.21bAB |
| TW5-2B6  | 0.78aA                                 | 41.05bAB  | 1.97aA  | 42.90bCD   | 2.04aA    | 41.70bB  |
| TW5-410  | 0.86aA                                 | 37.96bAB  | 2.34aA  | 25.08bD    | 2.33aA    | 51.50bAB |
| TW5-523  | 0.66aA                                 | 53.43bA   | 2.18aA  | 109.11bBC  | 2.35aA    | 47.31bAB |
| WT-T95   | 0.60aA                                 | 27.33bCB  | 2.29aA  | 26.05bD    | 2.29aA    | 62.05bAB |
| T95      | 0.81aA                                 | 35.14bABC | 2.24aA  | 204.17bA   | 2.20aA    | 73.20bA  |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

1. Os experimentos com as fontes de carbono Laminarina, Quitina e Celobiose foram realizados separadamente, e cada número representa a média de seis, oito e seis repetições, respectivamente.

Tabela 8 – Crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono.

| Mutantes | Peso de matéria sêca (mg) |                          |          |          |
|----------|---------------------------|--------------------------|----------|----------|
|          | Fibras de algodão         | Celulose microcristalina | CMC      | Glucose  |
| TW5      | 91.72 bD                  | 258.88 aB                | 2.99 dB  | 9.89 cB  |
| TW5-2B1  | 464.48 aAB                | 319.69 aB                | 21.42 cA | 45.70 bA |
| TW5-2B2  | 228.36 aBC                | 95.56 bC                 | 15.47 cA | 38.96 bA |
| TW5-2B6  | 420.73 aAB                | 357.56 aAB               | 16.39 cA | 45.14 bA |
| TW5-410  | 442.82 aAB                | 208.66 bB                | 19.18 dA | 46.00 cA |
| TW5-523  | 263.41 aABC               | 270.72 aB                | 13.54 cA | 41.52 bA |
| WT-T95   | 168.00 aC                 | 67.80 bC                 | 23.43 cA | 68.62 bA |
| T95      | 528.86 aA                 | 634.00 aA                | 21.67 cA | 38.65 bA |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Média de seis repetições.

Tabela 9 - Redução do crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5, em meio de BDA suplementado com o fungicida benomil.

| Mutantes | Redução do crescimento micelial (%) |         |           |          |         |         |         |         |
|----------|-------------------------------------|---------|-----------|----------|---------|---------|---------|---------|
|          | Concentrações (ppm)                 |         |           |          |         |         |         |         |
|          | 0                                   | 1       | 5         | 10       | 50      | 100     | 500     | 1000    |
| TW5-2B1  | 0.00aA                              | 0.00aD  | 0.00aG    | 0.00aE   | 0.00aD  | 0.00aD  | 0.00aD  | 0.00aE  |
| TW5-2B2  | 0.00aA                              | 0.00aD  | 0.00aG    | 0.00aE   | 0.00aD  | 0.00aD  | 0.00aD  | 0.00aE  |
| TW-410   | 0.00bA                              | 0.00bD  | 0.00bG    | 0.00bE   | 0.00bD  | 0.00bD  | 0.00bD  | 40.74aC |
| TW5-2B6  | 0.00cA                              | 0.00cD  | 0.00cG    | 0.00cE   | 0.00cD  | 0.00cD  | 27.77bC | 34.44aD |
| TW5-523  | 0.00cA                              | 0.00cD  | 0.00cG    | 0.00cE   | 42.59bC | 61.85aC | 61.11aB | 61.11aB |
| TW5-555  | 0.00dA                              | 0.00dD  | 67.03cDEF | 67.77cD  | 87.40bB | 88.88bB | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-537  | 0.00cA                              | 0.00cD  | 65.18bEF  | 69.25bD  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aa | 100.0aA |
| TW5-574  | 0.00cA                              | 0.00cD  | 70.74bD   | 72.22bD  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-534  | 0.00cA                              | 0.00cD  | 75.92bC   | 78.14bC  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-560  | 0.00dA                              | 0.00dD  | 64.07cF   | 81.11bBC | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-600  | 0.00dA                              | 0.00dD  | 71.10cCD  | 81.85bBC | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-609  | 0.00cA                              | 4.078cD | 82.59bB   | 83.70bB  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-612  | 0.00dA                              | 32.59cC | 69.25bDE  | 100.0aA  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5-533  | 0.00dA                              | 9.26cB  | 71.48bCD  | 100.0aA  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |
| TW5      | 0.00cA                              | 54.81bA | 100.0aA   | 100.0aA  | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA | 100.0aA |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Média de três repetições.

Tabela 10 - Ação do fungicida benomil sobre a esporulação dos mutantes de *T. harzianum* TW5, em meio de BDA suplementado com 1000ppm do fungicida.

| Mutantes | Conídios produzidos ( $10^6$ /ml) |            |
|----------|-----------------------------------|------------|
|          | 0ppm                              | 1000ppm    |
| TW5-2B2  | 13.4666 bA                        | 17.7500 aA |
| TW5-2B1  | 4.3200 aB                         | 1.3066 bB  |
| TW5-523  | 2.6000 bBC                        | 3.2666 aB  |
| TW5-2B6  | 2.3933 aBC                        | 2.4333 aB  |
| TW5-410  | 1.2433 bC                         | 1.9400 aB  |

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas para vertical e minúsculas para horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Média de três repetições.

Tabela 11 - Redução do crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em meio de BDA suplementado com o fungicida iprodione.

| Mutantes | Redução do crescimento micelial (%) |    |        |    |
|----------|-------------------------------------|----|--------|----|
|          | 0ppm                                |    | 500ppm |    |
| TW5      | 0.00                                | bA | 81.56  | aA |
| TW5-2B1  | 0.00                                | aA | 0.00   | aB |
| TW5-2B2  | 0.00                                | bA | 78.82  | aA |
| TW5-2B6  | 0.00                                | aA | 0.00   | aB |
| TW5-410  | 0.00                                | bA | 70.19  | aA |
| TW5-523  | 0.00                                | bA | 69.01  | aA |
| WT-T95   | 0.00                                | bA | 68.82  | aA |
| T95      | 0.00                                | aA | 50.00  | aA |

Médias seguidas por mesma letra, minúscula para horizontal e maiúscula para vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,001$ )  
Média de três repetições.

Tabela 12 - Sensibilidade de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em meio de cultura suplementado com benomil (pêso de matéria sêca em mg).

| Mutantes | Concentrações (ppm) |          |          |          |          |         |         |          |
|----------|---------------------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|----------|
|          | 0                   | 10       | 21.5     | 47       | 100      | 215     | 470     | 1000     |
| TW5-2B1  | 51.029bcA           | 37.09bA  | 30.21bA  | 42.44abA | 42.35abA | 43.06aA | 40.84aA | 36.11abA |
| TW5-2B2  | 34.849cA            | 38.16bA  | 31.00bA  | 32.48bA  | 37.48abA | 36.15aA | 39.34aA | 25.34bA  |
| TW5-2B6  | 55.61abcA           | 52.93abA | 51.76abA | 49.88abA | 48.86abA | 42.80aA | 40.59aA | 43.76abA |
| TW5-410  | 34.43cA             | 39.38bA  | 35.66bA  | 44.19abA | 34.48abA | 35.47aA | 52.55aA | 40.73abA |
| TW5-523  | 82.88abA            | 89.62aA  | 74.03aA  | 76.73aA  | 54.53aA  | 60.67aA | 61.27aA | 52.66aA  |
| T95      | 101.42aA            | 48.08abB | 42.06abB | 46.12abB | 37.79bB  | 33.86aB | 38.78aB | 53.80aB  |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula para horizontal e minúscula para vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,01$ ).  
Média de oito repetições.

Tabela 13 - Sensibilidade das linhagens selvagens *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em meio de cultura suplementado com benomil (Média de oito repetições)

| Mutantes | Concentrações (ppm) |         |         |         |          |          |         |        |
|----------|---------------------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|--------|
|          | 0                   | 0.1     | 0.21    | 0.47    | 1.0      | 2.15     | 4.7     | 10     |
| TW5      | 7.84aB              | 7.83aB  | 8.54aB  | 7.16abB | 4.29abBC | 4.01abBC | 3.28bcB | 2.74cB |
| WT-T95   | 99.35aA             | 99.48aA | 87.39aA | 62.13aA | 23.75bA  | 13.59bA  | 18.92bA | 4.10cA |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ )

Tabela 14 - Teste de antagonismo em confrontação direta de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 contra *S. sclerotiorum* #1, em meio de BDA.

| Mutantes               | Redução do crescimento (%) | Número de escleródios | Escala de notas |
|------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------|
| TW5-560                | 77.05 ab                   | 3.80                  | 2.0             |
| TW5-537                | 64.75 bcd                  | 4.40                  | 2.0             |
| TW5-410                | 69.75 abc                  | 4.80                  | 2.0             |
| TW5                    | 78.50 a                    | 5.00                  | 1.0             |
| TW5-523                | 69.25 abc                  | 5.00                  | 1.0             |
| TW5-533                | 55.75 d                    | 5.40                  | 3.0             |
| TW5-555                | 79.25 a                    | 5.40                  | 1.0             |
| TW5-534                | 69.50 abc                  | 6.00                  | 1.0             |
| TW5-609                | 72.25 abc                  | 6.08                  | 2.0             |
| TW5-574                | 74.50 abc                  | 6.16                  | 2.0             |
| TW5-600                | 63.52 cd                   | 8.60                  | 2.0             |
| TW5-612                | 63.25 cd                   | 9.00                  | 2.0             |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 00.00 e                    | 15.60                 | -               |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ )

Média de cinco repetições. Os valores médios das notas seguiram os critério de BELL *et al* (1982).

Tabela 15 - Atividade hiperparasítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, pelo no teste de antagonismo em confrontação direta, em meio de Aveia.

| Mutantes          | Número de escleródios formados |         |           |          |
|-------------------|--------------------------------|---------|-----------|----------|
|                   | Método I                       |         | Método II |          |
|                   | Exp. I                         | Exp. II | Exp. I    | Exp. II  |
| TW5               | 0.00 d                         | 2.00 b  | 4.60 cd   | 6.40 bcd |
| TW5-2B1           | 2.20 b                         | 2.00 b  | 9.40 b    | 9.80 bc  |
| TW5-2B2           | 1.20 bc                        | 1.80 b  | 4.20 cd   | 4.80 cd  |
| TW5-2B6           | 0.80 cd                        | 0.00 c  | 9.18 b    | 12.40 b  |
| TW5-410           | 0.00 d                         | 0.00 c  | 2.40 d    | 4.00 d   |
| TW5-523           | 0.40 cd                        | 0.40 c  | 3.40 d    | 5.80 cd  |
| WT-T95            | 0.00 d                         | 0.00 c  | 3.40 d    | 12.20 b  |
| T95               | 0.00 d                         | 3.00 b  | 7.20 bc   | 9.20 bc  |
| <i>S. sclero.</i> | 20.20 a                        | 20.20 a | 18.20 a   | 20.20 a  |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Média de cinco repetições.

Tabela 16 – Comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, contra *S. sclerotiorum* #1, sobre segmentos de aipo, *in vitro*.

| Mutantes               | Tamanho das lesões (cm) |   |         |   |                 |    |         |   |
|------------------------|-------------------------|---|---------|---|-----------------|----|---------|---|
|                        | <i>S. sclerotiorum</i>  |   |         |   | <i>S. minor</i> |    |         |   |
|                        | Exp. I                  |   | Exp. II |   | Exp. I          |    | Exp. II |   |
| TW5                    | 2.24                    | b | 1.05    | b | 0.00            | b  | 0.00    | b |
| TW5-2B1                | 2.82                    | b | 0.00    | c | 0.13            | b  | 0.31    | b |
| TW5-2B2                | 2.67                    | b | 0.00    | c | 0.38            | b  | 0.00    | b |
| TW5-2B6                | 2.26                    | b | 0.80    | b | 0.47            | b  | 0.38    | b |
| TW5-410                | 2.00                    | b | 0.00    | c | 0.54            | ab | 0.00    | b |
| TW5-523                | 2.85                    | b | 0.00    | c | 1.33            | ab | 0.45    | b |
| WT-T95                 | 3.01                    | b | 0.00    | c | 0.16            | b  | 0.00    | b |
| T95                    | 2.22                    | b | 0.00    | c | 0.00            | b  | 0.00    | b |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 3.25                    | a | 2.30    | a | 2.46            | a  | 3.56    | a |
| Controle               | 0.00                    | b | 0.00    | c | 0.00            | b  | 0.00    | b |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ).

Média de quatro repetições com quatro lesões cada.

Tabela 17 – Número de escleródios formados por *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor*, sobre segmentos de aipo, na presença de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95.

| Mutantes           | Número de escleródios formados |         |                 |         |
|--------------------|--------------------------------|---------|-----------------|---------|
|                    | <i>S. sclerotiorum</i> #1      |         | <i>S. minor</i> |         |
|                    | Exp. I                         | Exp. II | Exp. I          | Exp. II |
| TW5                | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| TW5-2B1            | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 45.00   |
| TW5-2B2            | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| TW5-2B6            | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| TW5-410            | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| TW5-523            | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| WT-T95             | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| T95                | 3.50                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |
| Controle inoculado | 0.50                           | 2.25    | 342.75          | 510.75  |
| Controle           | 0.00                           | 0.00    | 0.00            | 0.00    |

Média de quatro repetições sendo cada uma constituída da média de quatro lesões.



Tabela 18 – Influência do tempo de inoculação de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor* no comportamento antagônico de mutante de *T. harzianum* WTT95, sobre segmentos de aipo.

| Mutantes  | Tamanho das lesões/tempo de inoculação |         |         |        |                 |       |       |       |
|-----------|--|---------|---------|--------|-----------------|-------|-------|-------|
|           | <i>S. sclerotiorum</i> #1              |         |         |        | <i>S. minor</i> |       |       |       |
|           | 0h                                     | 12h     | 24h     | 36h    | 0h              | 12h   | 24h   | 36h   |
| WT-T95    | 2.88aA                                 | 2.68aB  | 2.78aA  | 1.50bB | 0.37b           | 0.00c | 0.59b | 0.23b |
| T95       | 2.88aA                                 | 2.95aAB | 2.70aA  | 1.79bB | 0.19b           | 0.17b | 0.99b | 0.56b |
| Inoculado | 3.744aA                                | 3.62aA  | 3.13abA | 2.62bA | 2.84a           | 1.91a | 2.91a | 2.62a |
| Controle  | 0.00aB                                 | 0.00aC  | 0.00aA  | 0.00aC | 0.00b           | 0.00c | 0.00b | 0.00b |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ).

Média de quatro repetições sendo cada uma constituida média de quatro lesões.

Tabela 19 – Número de escleródios formados por *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor* sobre segmentos de aipo, nos diferentes tempos de inoculação, na presença do mutante de *T. harzianum* WT-T95.

| Mutante   | Escleródios formados/tempo de inoculação |      |      |      |                 |        |        |        |
|-----------|--|------|------|------|-----------------|--------|--------|--------|
|           | <i>S. sclerotiorum</i>                   |      |      |      | <i>S. minor</i> |        |        |        |
|           | 0h                                       | 12h  | 24h  | 36h  | 0h              | 12h    | 24h    | 36h    |
| WT-T95    | 0.00                                     | 0.00 | 0.50 | 2.00 | 24.25           | 20.25  | 17.50  | 24.50  |
| T95       | 0.00                                     | 0.25 | 0.75 | 1.00 | 6.75            | 24.00  | 40.25  | 30.50  |
| Inoculado | 0.00                                     | 0.00 | 1.50 | 3.75 | 627.00          | 310.75 | 512.50 | 335.00 |
| Controle  | 0.00                                     | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00            | 0.00   | 0.00   | 0.00   |

Média de quatro repetições sendo cada uma a média de quatro lesões.

Tabela 20 - Comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor*, e a sobrevivência de plantas de alface.

| Mutantes           | Porcentagem de plantas sobreviventes |                 |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------|
|                    | <i>S. sclerotiorum</i> #1            | <i>S. minor</i> |
| TW5                | 44.44 abc                            | 93.33 a         |
| TW5-2B1            | 61.11 abc                            | 73.33 ab        |
| TW5-2B2            | 83.33 ab                             | 60.00 ab        |
| TW5-2B6            | 100.00 a                             | 100.00 a        |
| TW5-410            | 11.11 c                              | 73.33 ab        |
| TW5-523            | 33.33 abc                            | 20.00 b         |
| WT-T95             | 83.33 ab                             | 60.00 ab        |
| T95                | 100.00 a                             | 66.66 ab        |
| Controle inoculado | 27.78 bc                             | 20.00 b         |
| Controle           | 100.00 a                             | 100.00 a        |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si ao pelo teste de Tukey ( $p=0.05$ ).

Média de cinco e seis repetições para *S. sclerotiorum* e *S. minor*, respectivamente, contendo três plantas por vaso e dois escleródios/plantas.

Tabela 21 - Atividade hiperparasítica de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1

| Mutantes               | Porcentagem de recuperação de mutantes |           |
|------------------------|--|-----------|
|                        | Método I                               | Método II |
| TW5-523                | 100.00 a                               | 100.00 a  |
| TW5-410                | 100.00 a                               | 32.50 b   |
| TW5-609                | 100.00 a                               | 25.00 bc  |
| TW5                    | 100.00 a                               | 20.00 bc  |
| TW5-533                | 100.00 a                               | 15.00 bcd |
| TW5-560                | 100.00 a                               | 5.00 cd   |
| TW5-537                | 100.00 a                               | 5.00 cd   |
| TW5-600                | 100.00 a                               | 0.00 d    |
| TW5-534                | 95.55 a                                | 0.00 d    |
| TW5-555                | 51.11 b                                | 0.00 d    |
| TW5-574                | 31.11 b                                | 12.55 bcd |
| TW5-612                | 0.00 c                                 | 0.00 d    |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 0.00 c                                 | 0.00 d    |

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ). Média de cinco repetições com nove escleródios cada.

Tabela 22 - Avaliação de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na atividade hiperparasítica sobre os escleródios do *S. sclerotiorum* #1 formados no teste de antagonismo.

| Mutantes               | Porcentagem de escleródios viáveis |        |                 |                   |        |
|------------------------|------------------------------------|--------|-----------------|-------------------|--------|
|                        | Meio de BDA                        |        | Papel de filtro | Fatias de cenoura |        |
|                        | Exp.I                              | Exp.II | Exp.I           | Exp.I             | Exp.II |
| TW5                    | 45.00                              | 42.50  | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| TW5-2B1                | 100.00                             | 92.50  | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| TW5-2B2                | 7.50                               | 2.50   | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| TW5-2B6                | 90.00                              | 92.50  | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| TW5-410                | 69.99                              | 74.99  | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| TW5-523                | 100.00                             | 88.88  | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| WT-T95                 | 10.00                              | 7.50   | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| T95                    | 5.00                               | 7.50   | 0.00            | 100.00            | 100.00 |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 80.00                              | 82.50  | 100.00          | 100.00            | 100.00 |
| Controle               | -                                  | -      | -               | 0.00              | 0.00   |

Média de: a) para o teste em meio de BDA, quatro repetições com dez escleródios por placa, exceto para TW5-410 e TW5-523 com seis e nove escleródios, respectivamente; b) para o teste em papel de filtro, uma repetição constando de dois placas com dez metade de escleródios cada e, c) para o teste com fatias de cenoura, uma repetição constando de dois placas com dez metades de escleródios cada.

Tabela 23 - Atividade hiperparasítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1 e 2.

| Mutantes               | Viabilidade de escleródios |                      |                      |                      |
|------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                        | Meio de BDA                |                      | Fatias de cenoura    |                      |
|                        | <i>S. sclero.</i> #1       | <i>S. sclero.</i> #2 | <i>S. sclero.</i> #1 | <i>S. sclero.</i> #2 |
| TW5                    | 0.00 b                     | 0.00 c               | 100.00               | 100.00               |
| TW5-2B1                | 0.00 b                     | 0.00 c               | 100.00               | 100.00               |
| TW5-2B2                | 0.00 b                     | 0.00 c               | 100.00               | 100.00               |
| TW5-2B6                | 0.00 b                     | 4.76 c               | 100.00               | 100.00               |
| TW5-410                | 0.00 b                     | 9.52 bc              | 100.00               | 100.00               |
| TW5-523                | 34.92 ab                   | 44.44 ab             | 100.00               | 100.00               |
| WT-T95                 | 51.59 a                    | 9.52 bc              | 100.00               | 100.00               |
| T95                    | 15.08 ab                   | 44.44 ab             | 100.00               | 100.00               |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 69.52 a                    | 84.92 a              | 100.00               | 100.00               |

Média seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Média de : a) meio de BDA e fatias de cenoura, três repetições contendo de seis/sete ou dez escleródios por placa, respectivamente.

Tabela 24 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* #1 e 2, *in vitro*.

| Mutantes               | Número de estirpes e/ou apotécios formados |  |                           |         |
|------------------------|--|--|---------------------------|---------|
|                        | <i>S. sclerotiorum</i> #1                  |  | <i>S. sclerotiorum</i> #2 |         |
|                        | Exp. I                                     |  | Exp. I                    | Exp. II |
| TW5                    | 6.87 ab                                    |  | 1.45 b                    | 1.20 c  |
| TW5-2B1                | 3.75 b                                     |  | 1.63 b                    | 1.53 bc |
| TW5-2B2                | 5.60 ab                                    |  | 1.85 b                    | 1.30 bc |
| TW5-2B6                | 3.32 b                                     |  | 1.85 b                    | 1.63 bc |
| TW5-410                | 3.75 b                                     |  | 2.13 b                    | 1.15 c  |
| TW5-523                | 5.95 ab                                    |  | 1.95 b                    | 1.53 bc |
| TW5-WT-T95             | 4.75 ab                                    |  | 2.10 b                    | 1.52 bc |
| TW5-T95                | 6.45 ab                                    |  | 1.80 b                    | 2.15 b  |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 10.22 a                                    |  | 4.48 a                    | 7.97 a  |

Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.01$ ). Média de quatro repetições sendo cada uma constituída da média de dez escleródios.

Tabela 25 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 no número de estipes e/ou apotécios de *S. sclerotiorum* #2 formados e tratados em condições de laboratório, e observados na superfície dos vasos.

| Mutantes               | Número de estipes e/ou apotécios formados |          |
|------------------------|---|----------|
|                        | Exp. I                                    | Exp. II  |
| TW5                    | 2.33 bc                                   | 3.50 abc |
| TW5-2B1                | 1.50 bc                                   | 2.50 bc  |
| TW5-2B2                | 1.83 bc                                   | 2.33 bc  |
| TW5-2B6                | 0.50 c                                    | 3.50 abc |
| TW5-410                | 3.00 abc                                  | 1.17 cd  |
| TW5-523                | 0.67 c                                    | 3.83 ab  |
| WT-T95                 | 7.00 a                                    | 2.83 bc  |
| T95                    | 0.50 c                                    | 2.00 bc  |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 5.17 ab                                   | 6.17 a   |
| Controle               | 0.00 c                                    | 0.00 d   |

Médias seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p=0.05$ ).

Média de seis repetições contendo três plantas por vaso e dois escleródios por planta.

Tabela 26 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre estipes e/ou apotécios do *S. sclerotiorum* # 1 formados e tratados em condições de laboratório, e a sobrevivência de plantas de alface.

| Mutantes               | Porcentagem de plantas sobreviventes |           |
|------------------------|--------------------------------------|-----------|
|                        | Exp. I                               | Exp. II   |
| TW5                    | 38.09 b                              | 38.09 bcd |
| TW5-2B1                | 42.86 b                              | 19.05 cd  |
| TW5-2B2                | 47.62 b                              | 66.66 abc |
| TW5-2B6                | 38.09 b                              | 19.05 cd  |
| TW5-410                | 76.19 ab                             | 66.66 abc |
| TW5-523                | 76.19 ab                             | 80.95 ab  |
| WT-T95                 | 33.33 b                              | 33.33 bcd |
| T95                    | 66.67 ab                             | 42.85 bcd |
| <i>S. sclerotiorum</i> | 42.85 b                              | 14.28 d   |
| Controle               | 100.00 a                             | 100.00 a  |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p=0.05$ ).

Média de sete repetições contendo três plantas por vaso e dois escleródios por planta.

Tabela 27 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 no número de estipes por *S. sclerotiorum* #1 e 2, em presença dos fungicidas benomil e iprodione.

| Mutantes          | Número de estipes formadas |         |           |                           |         |           |
|-------------------|----------------------------|---------|-----------|---------------------------|---------|-----------|
|                   | <i>S. sclerotiorum</i> #1  |         |           | <i>S. sclerotiorum</i> #2 |         |           |
|                   | Controle <sup>1</sup>      | Benomil | Iprodione | Controle                  | Benomil | Iprodione |
| TW5               | 5.00                       | 4.20a   | 2.73abc   | 2.04aB                    | 1.00bAB | 1.16bA    |
| TW5-2B1           | 3.63                       | 0.83c   | 2.37bc    | 1.45aBC                   | 0.62bBC | 0.33bC    |
| TW5-2B2           | 4.00                       | 1.57bc  | 1.60bc    | 1.33aBC                   | 0.14bC  | 0.10bC    |
| TW5-2B6           | 3.77                       | 2.03abc | 1.90abc   | 1.41aBC                   | 0.58bBC | 0.14cC    |
| TW5-410           | 3.97                       | 0.77c   | 1.63bc    | 1.50aBC                   | 0.41bC  | 0.33bC    |
| TW5-523           | 3.00                       | 0.80c   | 1.03c     | 1.16aC                    | 0.62bBC | 0.16cC    |
| WT-T95            | 5.80                       | 3.53ab  | 3.10ab    | 1.58aBC                   | 1.33aA  | 0.45bBC   |
| T95               | 4.53                       | 0.80c   | 1.10c     | 1.00aC                    | 1.29bC  | 0.41bC    |
| <i>S. sclero.</i> | 6.73                       | 4.23a   | 4.10a     | 3.91aA                    | 1.87bA  | 1.08bAB   |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Média de três repetições sendo cada uma a média de dez para o experimento I e oito escleródios para o experimento II.

<sup>1</sup> Dados não significativos ao nível de  $p=0.05$ .

Tabela 28 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 no número de estipes e/ou apotécios formados por *S. sclerotiorum* #2, na presença dos fungicidas benomil e iprodione, e plantas de alface.

| Mutantes          | Número de estipes e/ou escleródios formados |         |           |          |         |           |
|-------------------|---|---------|-----------|----------|---------|-----------|
|                   | Exp. I                                      |         |           | Exp. II  |         |           |
|                   | Controle                                    | Benomil | Iprodione | Controle | Benomil | Iprodione |
| TW5               | 0.28aB                                      | 0.40aA  | 0.48aAb   | 0.40abAB | 0.00bA  | 0.68aAB   |
| TW5-2B1           | 0.12aB                                      | 0.00aA  | 0.08aB    | 0.00bB   | 0.32abA | 0.52aABC  |
| TW5-2B2           | 0.20aB                                      | 0.00aA  | 0.48aAB   | 0.24aAB  | 0.00aA  | 0.00aC    |
| TW5-2B6           | 0.20aB                                      | 0.00aA  | 0.48aAB   | 0.32abAB | 0.00aA  | 0.56aABC  |
| TW5-410           | 0.08aB                                      | 0.00aA  | 0.00aB    | 0.36aAB  | 0.00aA  | 0.08aABC  |
| TW-523            | 0.08aB                                      | 0.00aA  | 0.48aAB   | 0.04aB   | 0.00aA  | 0.04aBC   |
| WT-T95            | 0.68aAB                                     | 0.16bA  | 0.32abAB  | 0.36aAB  | 0.00aA  | 0.24aABC  |
| T95               | 0.44aB                                      | 0.00aA  | 0.08aB    | 0.04aB   | 0.00aA  | 0.04aBC   |
| <i>S. sclero.</i> | 1.48aA                                      | 0.00bA  | 0.88aA    | 0.88aA   | 0.16bA  | 0.68aA    |
| Controle          | 0.00aB                                      | 0.00aA  | 0.00aB    | 0.00aB   | 0.00aA  | 0.00aC    |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Média de cinco repetições sendo três plantas por vaso e três escleródios por planta.

Tabela 29 - Influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #2 em presença dos fungicidas benomil e iprodione, e a sobrevivência de plantas de alface, em condições de casa-de-vegetação.

| Mutantes         | Porcentagem de plantas sobreviventes |           |           |           |          |           |
|------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
|                  | Exp. I                               |           |           | Exp. II   |          |           |
|                  | Controle                             | Benomil   | Iprodione | Controle  | Benomil  | Iprodione |
| TW5              | 46.66bcd                             | 46.66bB   | 86.66aA   | 100.00aA  | 73.33aA  | 80.00aA   |
| TW5-2B1          | 93.33aAB                             | 100.00aA  | 100.00aA  | 66.66bABC | 100.00aA | 93.33abA  |
| TW5-2B2          | 80.00aABC                            | 100.00aA  | 100.00aA  | 93.33aAB  | 100.00aA | 100.00aA  |
| TW5-2B6          | 46.66bcd                             | 100.00aA  | 100.00aA  | 60.00bABC | 100.00aA | 100.00aA  |
| TW5-410          | 26.66bd                              | 86.66aAB  | 100.00aA  | 80.00aABC | 100.00aA | 100.00aA  |
| TW5-523          | 66.66aABCD                           | 100.00aA  | 100.00aA  | 86.66aABC | 100.00aA | 100.00aA  |
| WT5-T95          | 33.33bcd                             | 73.33aAB  | 66.66abA  | 66.66bABC | 100.00aA | 93.33abA  |
| T95              | 46.66bcd                             | 100.00aA  | 93.33aA   | 53.33bBC  | 93.33aA  | 93.33aA   |
| <i>S. scler.</i> | 46.66bcd                             | 80.00abAB | 100.00aA  | 46.66bC   | 100.00aA | 100.00aA  |
| Controle         | 100.0aA                              | 100.00aA  | 100.00aA  | 100.00aa  | 100.00aA | 100.00aA  |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na vertical e minúscula na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Média de cinco repetições contendo três plantas por vaso e três escleródios por planta.

Tabela 30 - Comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 como promotores de crescimento em plantas de alface.

| Mutantes | Matéria fresca (mg) | Mutantes | Matéria fresca (mg) |
|----------|---------------------|----------|---------------------|
| TW5      | 76.77bc             | TW5-523  | 72.19c              |
| TW5-2B1  | 85.03ab             | WT-T95   | 78.25bc             |
| TW5-2B2  | 92.86a              | T95      | 81.91abc            |
| TW5-2B6  | 84.34ab             | Controle | 77.47bc             |
| TW5-410  | 76.01bc             |          |                     |

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Média de cinco repetições contendo duas plantas por vaso.

Tabela 31 - Comportamento de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 como promotores de crescimento em plantas de alface, em presença dos fungicidas benomil e iprodione.

| Mutantes | Peso de matéria fresca (mg) |           |           |            |            |            |
|----------|-----------------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
|          | Exp. I                      |           |           | Exp. II    |            |            |
|          | Controle                    | Benomil   | Iprodione | Controle   | Benomil    | Iprodione  |
| TW5      | 62.53aBC                    | 65.33aAB  | 53.35bDE  | 20.442aC   | 22.423aDE  | 12.954bC   |
| TW5-2B1  | 67.75aAB                    | 70.80aA   | 72.36aA   | 22.121aBC  | 27.524aCDE | 13.537bC   |
| TW5-2B2  | 71.16aA                     | 67.18aAB  | 59.72bCD  | 32.571Aa   | 29.001aCD  | 21.137bABC |
| TW5-2B6  | 68.24aAB                    | 65.82aAB  | 66.70aABC | 34.211aA   | 40.523aAB  | 26.001bA   |
| TW5-410  | 67.56abAB                   | 61.83bB   | 68.75aAB  | 25.895aABC | 31.783aBC  | 17.055bABC |
| TW5-523  | 65.63abAB                   | 70.19aA   | 60.93bBCD | 30.829bAB  | 41.839aA   | 24.693bAB  |
| WT-T95   | 67.93aAB                    | 64.46aAB  | 68.87aAB  | 26.839aABC | 19.026bE   | 13.533bC   |
| T95      | 65.05bABC                   | 67.65abAB | 73.65aA   | 32.797bA   | 42.649aA   | 17.253cABC |
| Controle | 57.13bC                     | 63.82aAB  | 46.99cE   | 22.322aBC  | 20.989aDE  | 15.439aBC  |

Médias seguidas por mesma letra, maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Média de cinco repetições contendo duas plantas por vaso.



## APÊNDICE

Apêndice 1 – Valores e significâncias dos quadrados médios (QM) e coeficientes de variação (CV) da redução do crescimento micelial de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5, nos meios de cultura BDA e Aveia.

| Causas de Variação        | GL  | QM                  |
|---------------------------|-----|---------------------|
| Meios de cultivo          | 1   | 0.771*              |
| Mutantes                  | 11  | 10.992**            |
| Meios x Mutantes          | 11  | 0.306 <sup>ns</sup> |
| Tempos                    | 3   | 744.782**           |
| Meios x Tempos            | 3   | 0.977**             |
| Mutantes x Tempos         | 33  | 2.021**             |
| Meios x Mutantes x Tempos | 33  | 0.345*              |
| Resíduo                   | 192 | 0.197               |

CV = 7.65%

\* e \*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.  
<sup>ns</sup> não significativo.

Apêndice 2 – Valores e significâncias dos QM e CV da caracterização de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 quanto à esporulação nos meios de cultura BDA e Aveia.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Meios de cultura   | 1  | 3.632**  |
| Mutantes           | 11 | 11.307** |
| Meios x Mutantes   | 11 | 3.183**  |
| Resíduos           | 48 | 0.232    |

CV = 13.0%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\text{arc sen}\sqrt{\%}$ .

Apêndice 3 – Valores e significâncias dos QM e CV da porcentagem de redução do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* #1 por metabólitos produzidos pelos mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5. (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM        |           |
|--------------------|----|-----------|-----------|
|                    |    | Exp. I    | Exp. II   |
| Tratamentos        | 12 | 3939.13** | 2227.57** |
| Resíduo            | 26 | 271.63    | 14.90     |

CV = 78.68 e 38.03%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Apêndice 4 – Valores e significâncias dos QM e CV da atividade celulolítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 – Método semi-quantitativo.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Tratamentos        | 15 | 262.68** |
| Resíduos           | 32 | 6.35     |

CV = 18.82%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> A atividade enzimática foi expressa pela área total de degradação, obtida pela fórmula: área de halo =  $\pi/4 \times (D^2 - d^2)$ .

Apêndice 5 – Valores e significâncias dos QM e CV da produção micelial de mutantes de *T. harzianum* WT5 e *T. harzianum* WT-T95 em meio contendo Laminarina (2%).<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Blocos             | 5  | 0.037*   |
| Laminarina         | 1  | 40.383** |
| Mutantes           | 7  | 0.071**  |
| Laminarina x Mut.  | 7  | 0.032*   |
| Resíduos           | 75 | 0.014    |

CV = 12.94%

\* e \*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

<sup>1</sup> Dados transformados em log (x+1).

Apêndice 6 – Valores e significâncias dos QM e CV da produção micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 em meio contendo Quitina (2%).<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Repetições         | 6  | 0.118*   |
| Quitina            | 7  | 0.396**  |
| Mutantes           | 1  | 49.433** |
| Quitina x Mutantes | 7  | 0.422**  |
| Resíduos           | 90 | 0.042    |

CV = 17.86%

\* e \*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

<sup>1</sup> Dados transformados em log (x+1)

Apêndice 7 - Valores e significância dos QM e CV da produção micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 em meio de cultura líquido Czapeck-Dox suplementado com a fonte de carbono Celobiose (2%).<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Blocos             | 5  | 0.053**  |
| Mutantes           | 7  | 0.224**  |
| Celobiose          | 1  | 31.746** |
| Mut. x Celobiose   | 7  | 0.171**  |
| Resíduo            | 75 | 0.016    |

CV = 12.01%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em log (x+1).

Apêndice 8 - Valores e significâncias dos QM e CV da produção micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 em meio contendo diferentes fontes de carbono.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL  | QM                  |
|--------------------|-----|---------------------|
| Blocos             | 5   | 0.046 <sup>ns</sup> |
| Mutantes           | 7   | 0.970**             |
| Carbono            | 3   | 16.849**            |
| Mutantes x Carbono | 21  | 0.316**             |
| Resíduos           | 155 | 0.035               |

CV = 12.76%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em log(x+1).

Apêndice 9 - Valores e significâncias dos QM e CV da ação do benomil sobre a redução do crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 em meio de cultura BDA suplementado.

| Causas de Variação | GL  | QM          |
|--------------------|-----|-------------|
| Mutantes           | 14  | 23560.702** |
| Doses              | 7   | 40688.872** |
| Mutantes x Doses   | 98  | 1228.349**  |
| Resíduo            | 240 | 2.239       |

CV = 3.0%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Apêndice 10 - Valores e significâncias dos QM e CV da ação do benomil sobre a esporulação de mutantes de *T. harzianum* TW5, em meio de BDA.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Doses              | 1  | 2.587*    |
| Mutantes           | 4  | 208.935** |
| Doses x Mutantes   | 4  | 9.419**   |
| Resíduo            | 20 | 0.599     |

CV = 15.18%

\*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\log(x+1)$ .

Apêndice 11 - Valores e significâncias dos QM e CV da ação do fungicida iprodione sobre o crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM                    |
|--------------------|----|-----------------------|
| Repetições         | 2  | 120.462 <sup>ns</sup> |
| Doses              | 1  | 19788.034**           |
| Mutantes           | 7  | 989.534**             |
| Doses x Mutantes   | 7  | 989.534**             |
| Resíduos           | 30 | 117.006               |

CV = 46.68%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\text{arc Sen } \sqrt{x}$ .

Apêndice 12 - Valores e significâncias dos QM e CV da ação do benomil sobre a redução do crescimento micelial de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL  | QM      |
|--------------------|-----|---------|
| Blocos             | 7   | 0.305** |
| Doses              | 7   | 0.139** |
| Mutantes           | 5   | 0.698** |
| Doses x Mutantes   | 35  | 0.058** |
| Resíduo            | 329 | 0.025   |

CV = 9.57%

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\log(x+1)$ .

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Apêndice 13 - Valores e significâncias dos QM e CV da ação de benomil sobre a redução do crescimento micelial das linhagens selvagens *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum*.<sup>1</sup>

| Causas de Variação  | GL  | QM       |
|---------------------|-----|----------|
| Blocos              | 7   | 0.081**  |
| Doses               | 7   | 1.748**  |
| Linhagens selvagens | 1   | 16.133** |
| Doses x selvagens   | 7   | 0.454**  |
| Resíduo             | 105 | 0.030    |

CV = 15.37%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\log(x+1)$ .

Apêndice 14 - Valores e significância dos QM e CV da porcentagem de redução do crescimento micelial de *S.sclerotiorum* #1, pelos mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5, no teste de antagonismo em confrontação direta, *in vitro*.

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Tratamentos        | 12 | 2102.31** |
| Resíduo            | 52 | 25.17     |

CV = 7.79%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Apêndice 15 - Valores e significâncias dos QM e CV da atividade de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na formação de escleródios por *S.sclerotiorum* # 1, sobre meio de Aveia, *in vitro*.<sup>1</sup> (Método I - Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 8  | 3.49** | 2.93**  |
| Resíduos           | 36 | 0.13   | 0.20    |

CV = 13.90 e 14.50%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+0.5}$

Apêndice 16 - Valores e significâncias dos QM e CV da atividade de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na formação de escleródios por *S. sclerotiorum* #1 pelo teste de culturas pareadas, *in vivo*.<sup>1</sup> (Método II - Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 8  | 7.63** | 7.38**  |
| Resíduos           | 36 | 0.04   | 0.11    |

CV = 14.36 e 22.59%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+0.5}$

Apêndice 17 - Valores e significâncias dos QM e CV do comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 contra *S. sclerotiorum* #1, em segmentos de aipo, *in vitro*.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 9  | 0.36** | 0.31**  |
| Resíduos           | 30 | 0.02   | 0.01    |

CV = 7.78 e 7.06%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 18 - Valores e significâncias dos QM e CV do comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 contra *S. minor*, em segmentos de aipo, *in vitro*.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 9  | 0.30** | 0.49**  |
| Resíduos           | 30 | 0.05   | 0.02    |

CV = 18.82 e 12.12%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 19 – Valores e significância dos QM e CV da influência do tempo da inoculação de *S. sclerotiorum* #1 e *S. minor*, sobre o comportamento antagônico de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95, em segmentos de aipo.<sup>1</sup>

| Causas de Variação  | GL | QM                   |                     |
|---------------------|----|----------------------|---------------------|
|                     |    | <i>S. sclero.</i> #1 | <i>S. minor</i>     |
| Blocos              | 3  | 0.055**              | 0.037 <sup>ns</sup> |
| Tempo de inoculação | 3  | 3.623**              | 2.514**             |
| Mutantes            | 3  | 0.201**              | 0.114**             |
| Tempo x Mutantes    | 9  | 0.029**              | 0.026 <sup>ns</sup> |
| Resíduos            | 45 | 0.090                | 0.019               |

CV = 5.71 e 10.63%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 20 – Valores e significância dos QM e CV da influência do tempo da inoculação (0, 12, 24 e 36h) de *S. minor* sobre o comportamento antagônico de mutante de *T. harzianum* WT5 e *T. harzianum* WT-T95, em segmentos de aipo, *in vitro*.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM     |        |        |        |
|--------------------|----|--------|--------|--------|--------|
|                    |    | 0h.    | 12h.   | 24h.   | 36h.   |
| Tratamentos        | 3  | 0.79** | 0.46** | 0.68** | 0.66** |
| Resíduos           | 12 | 0.01   | 0.00   | 0.04   | 0.03   |

CV = 8.07, 5.74, 13.44, 13.39%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 21 – Valores e significâncias dos QM e CV das interações entre mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* # 1, e a sobrevivência de plantas de alface, *in vivo*.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Tratamentos        | 9  | 5015.55** |
| Resíduos           | 50 | 897.77    |

CV = 52.13%.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\arcsen \sqrt{\%}$



Apêndice 22 - Valores e significâncias dos QM e CV das interações entre os mutantes de *T. harzianum* WT5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. minor* e plantas de alface.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Tratamentos        | 9  | 3104.86** |
| Resíduos           | 40 | 470.87    |

CV = 36.88%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em arc sen  $\sqrt{\%}$

Apêndice 23 - Valores e significâncias dos QM e CV da atividade hiperparasítica de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1.<sup>1</sup> (Método I)

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Tratamentos        | 16 | 4879.70** |
| Resíduo            | 68 | 65.45     |

CV = 11.30%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em arc sen  $\sqrt{\%}$ .

Apêndice 24 - Valores e significâncias dos QM e CV da atividade hiperparasítica de mutantes auxotróficos de *T. harzianum* TW5 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1.<sup>1</sup> (Método II)

| Causas de Variação | GL | QM        |
|--------------------|----|-----------|
| Tratamentos        | 16 | 2279.05** |
| Resíduo            | 51 | 67.95     |

CV = 44.35%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em arcsen  $\sqrt{\%}$ .

Apêndice 25 - Valores e significâncias dos QM e CV da atividade hiperparasítica de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #1.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM                  |                     |
|--------------------|----|---------------------|---------------------|
|                    |    | <i>S.sclero.</i> #1 | <i>S.sclero.</i> #2 |
| Tratamentos        | 8  | 1454.41**           | 1603.05**           |
| Resíduos           | 18 | 163.84              | 119.31              |

CV = 70.42 e 51.00%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em arc sen  $\sqrt{\%}$

Apêndice 26 – Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* WT5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum*#1.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM     |
|--------------------|----|--------|
|                    |    |        |
| Tratamentos        | 8  | 0.67** |
| Resíduos           | 27 | 0.16   |

CV = 15.67%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 27 – Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutante de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* #2, *in vitro*.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 8  | 0.92** | 0.21**  |
| Resíduos           | 27 | 0.01   | 0.01    |

CV = 6.15 e 5.32%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 28 – Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 no número de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* # 2, e plantas de alface, *in vivo*.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM     |         |
|--------------------|----|--------|---------|
|                    |    | Exp. I | Exp. II |
| Tratamentos        | 9  | 1.92** | 1.22**  |
| Resíduos           | 50 | 0.24   | 0.12    |

CV = 29.59 e 18.26%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 29 - Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* #1, e a sobrevivência de plantas de alface.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL | QM       |           |
|--------------------|----|----------|-----------|
|                    |    | Exp. I   | Exp. II   |
| Tratamentos        | 9  | 2588.40* | 4319.54** |
| Resíduo            | 60 | 1150.41  | 617.70    |

CV = 67.82 e 57.99%, respectivamente.

\* e \*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

<sup>1</sup> Dados transformados em arc sen  $\sqrt{\%}$

Apêndice 30 - Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* #1 2, em presença de benomil e iprodione, *in vivo*.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM                  |                     |
|--------------------|----|---------------------|---------------------|
|                    |    | <i>S.sclero</i> #1  | <i>S.sclero</i> .#2 |
| Blocos             | 2  | 0.319**             | 0.007 <sup>ns</sup> |
| Fungicidas         | 2  | 3.245**             | 1.369**             |
| Mutantes           | 8  | 0.794**             | 0.266**             |
| Fungicidas x Mut.  | 16 | 0.071 <sup>ns</sup> | 0.032**             |
| Resíduos           | 52 | 0.043               | 0.008               |

CV = 10.85%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 31 - Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 na produção de estipes e/ou apotécios por *S. sclerotiorum* #1, na ausência e presença dos fungicidas benomil e iprodione.<sup>1</sup>

| Causas de Variação | GL | QM                 |         |           |
|--------------------|----|--------------------|---------|-----------|
|                    |    | ausência           | benomil | iprodione |
| Tratamentos        | 8  | 0.18 <sup>ns</sup> | 0.53**  | 0.23**    |
| Resíduos           | 18 | 0.09               | 0.04    | 0.04      |

CV = 12.74, 11.51 e 10.79%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 32 – Valores e significâncias dos QM e CV da influência de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 no número de estipes e/ou apotécios formados por *S. sclerotiorum* #2, em presença dos fungicidas benomil e iprodione e plantas de alface.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL  | QM                  |                     |
|--------------------|-----|---------------------|---------------------|
|                    |     | Exp. I              | Exp. II             |
| Blocos             | 4   | 0.030 <sup>ns</sup> | 0.005 <sup>ns</sup> |
| Mutantes           | 9   | 0.129**             | 0.085**             |
| Fungicidas         | 2   | 0.207**             | 0.153**             |
| Fungicidas x Mut.  | 18  | 0.051**             | 0.031*              |
| Resíduos           | 116 | 0.020               | 0.016               |

CV = 12.90 e 11,81%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 33 – Valores e significâncias dos QM e CV de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 sobre escleródios de *S. sclerotiorum* #2, presença dos fungicidas benomil e iprodione e plantas de alface.<sup>1</sup> (Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL  | QM          |                       |
|--------------------|-----|-------------|-----------------------|
|                    |     | Exp. I      | Exp. II               |
| Blocos             | 4   | 1019.122*   | 503.849 <sup>ns</sup> |
| Mutantes           | 9   | 2402.508**  | 525.453 <sup>ns</sup> |
| Fungicidas         | 2   | 13794.166** | 5102.457**            |
| Fungicidas x Mut.  | 18  | 744.164*    | 629.144*              |
| Resíduo            | 116 | 416.905     | 312.573               |

CV = 28.53 e 22.36%, respectivamente.

\* e \*\* Significativo ao nível de 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo.

<sup>1</sup> Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

Apêndice 34 - Valores e significâncias dos QM e CV de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 como promotores de crescimento de plantas de alface.

| Causas de Variação | GL | QM       |
|--------------------|----|----------|
| Tratamentos        | 8  | 192.09** |
| Resíduo            | 36 | 30.35    |

CV = 6.84%

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Apêndice 35 - Valores e significâncias dos QM e CV de mutantes de *T. harzianum* TW5 e *T. harzianum* WT-T95 como promotores de crescimento de plantas de alface, em presença dos fungicidas benomil e iprodione.(Exp. I e II)

| Causas de Variação | GL  | QM                   |                      |
|--------------------|-----|----------------------|----------------------|
|                    |     | Exp. I               | Exp. II              |
| Blocos             | 4   | 13.147 <sup>ns</sup> | 38.738 <sup>ns</sup> |
| Mutantes           | 8   | 290.459**            | 528.802**            |
| Fungicidas         | 2   | 106.357**            | 1969.475**           |
| Fungicidas x Mut.  | 16  | 119.117**            | 75.291**             |
| Resíduo            | 104 | 16.454               | 20.958               |

CV = 6.22 e 18.03%, respectivamente.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F.